

Aus dem Zentrum
für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner

Klinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner

**PROTOPORPHYRIN IX FLUORESZENZ NACH
TOPISCHER 5-AMINOLÄVULINSÄURE (ALA)-
APPLIKATION:
KLINISCHE EVALUATION EINES NEUEN
DIAGNOSEVERFAHRENS FÜR
KOPF-HALS-KARZINOME**

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Nicola Klahr
aus Werne an der Lippe

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 06.02.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. R. Arnold
Referent: Priv.-Doz. Dr. B.M. Lippert
Korreferent: Prof. Dr. Lavinia Flores de Jacoby

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
2	<u>FRAGESTELLUNG</u>	9
3	<u>PATIENTEN UND METHODEN</u>	10
3.1	PATIENTEN	10
3.2	METHODEN	12
3.2.1	PRINZIP DER GEWEBEFLUORESZENZ	12
3.2.2	AMINOLÄVULINSÄURE (ALA)	13
3.2.3	APPLIKATIONSFORMEN VON ALA	15
3.2.4	TECHNISCHE GRUNDLAGEN (GERÄTEBESCHREIBUNG)	16
3.2.5	UNTERSUCHUNGSABLAUF	20
3.2.5.1	Untersuchungsablauf bei Schleimhautveränderungen des oberen Aerodigestivtraktes	20
3.2.5.2	Untersuchungsablauf bei Veränderungen der Kopfhaut	22
4	<u>ERGEBNISSE:</u>	24
4.1	FLUORESZENZ-ERGEBNISSE	24
4.2	HISTOPATHOLOGIE	29
4.3	AUTOFLUORESZENZ UND ALA-FLUORESZENZ	36
4.4	STÖRFAKTOREN	37
5	<u>DISKUSSION:</u>	41
5.1	GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZDIAGNOSTIK	44
5.1.1	AUTOFLUORESZENZ	44
5.1.2	ALA-INDUZIERTER FLUORESZENZ	45
5.2	STELLENWERT DER FLUORESZENZENDOSKOPIE IN DER KLINISCHEN ANWENDUNG VOR DEM HINTERGRUND DER EIGENEN ERGEBNISSE	51
5.2.1	TUMOREN DER GESICHTSHAUT	51
5.2.2	SCHLEIMHAUTLÄSIONEN DES OBEREN AERODIGESTIVTRAKTES	52
5.2.3	REZIDIVIERENDE RESPIRATORISCHE PAPILLOMATOSE	54
5.2.4	AF UND ALAF IM VERGLEICH	56
5.2.5	NEBENWIRKUNGEN DER FLUORESZENZENDOSKOPIE	58
5.3	STÖRFAKTOREN DER FLUORESZENZDIAGNOSTIK	59
5.3.1	TECHNISCHE ASPEKTE	59
5.3.2	LICHTABSORPTION DURCH BLUT	60
5.3.3	PHOTBLEACHING (AUSBLEICHEN)	61
5.3.4	BAKTERIENARTEFAKTE	62
5.3.5	VARIABLE „MENSCH“	63
5.4	AUSBLICK	64
5.4.1	OPTIMIERUNG DER METHODIK	65
5.4.2	FLUORESZENDIAGNOSTIK ALS SCREENINGVERFAHREN	67
5.4.3	FLUORESZENZ-GESTÜTZTE LASERRESEKTION, PHOTODYNAMISCHE THERAPIE	68
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	72
7	<u>ABKÜRZUNGEN:</u>	74

8	<u>LITERATUR:</u>	<u>75</u>
----------	--------------------------	------------------

2	<u>ANHANG</u>	<u>96</u>
----------	----------------------	------------------

1 Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom ist mit über 90% der häufigste maligne Tumor im Bereich der Schleimhäute der oberen Luft- und Speisewege [Statistisches Landesamt Saarland, 1996; Werner 1997]. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der 5. und 7. Lebensdekade. Männer sind etwa viermal häufiger betroffen als Frauen, wobei sich in den letzten Jahren der Anteil an Frauen deutlich erhöht hat [Boring et al., 1993; Platz et al., 1988; Werner 1997]. Als ätiologische Faktoren gelten eine vermehrte Sonneneinstrahlung, Nikotin und Alkoholabusus sowie eine mangelnde Mundhygiene. Der über Jahre betriebene chronische Alkohol- und Nikotinabusus, der durch gesellschaftliche Entwicklungen in den vergangenen Jahren weiter stetig zugenommen hat, fördert durch synergistische Effekte die Karzinogenese [Johnsen et al., 1996].

Die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege hat in den letzten Jahrzehnten keine grundlegenden Neuerungen erfahren. Sie stützt sich nach wie vor auf chirurgische, strahlentherapeutische und chemotherapeutische Maßnahmen. Die Verbesserung der Tumorresektion einschließlich der endoskopischen Laserresektion sowie Optimierung der Rekonstruktionsverfahren bei radikaler Tumorresektion, die Modulation der Strahlentherapie sowie die Weiterentwicklungen der Chemotherapie und die aufeinander abgestimmte Kombination der genannten Therapieverfahren ermöglichten eine bessere Beherrschung des Primärtumors. Für den Patienten bedeutete dies deutliche Fortschritte im Sinne einer verbesserten Lebensqualität, obgleich die Überlebensrate davon unwesentlich beeinflusst blieb [Silvermann, 1992].

Die insgesamt schlechte Prognose wird insbesondere durch die bei der Diagnosestellung bereits vorhandenen Lymphknotenmetastasen bestimmt. Des weiteren entwickeln 15-20 % der Patienten neben dem Primärkarzinom ein syn- oder metachrones Zweitkarzinom im Bereich der Schleimhäute der oberen Luft- und Speisewege [Dhooge et al., 1996; Natsugoe et al., 1997], da durch die lange Noxeneinwirkung die gesamte Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes (sog. „condemned mucosa“) geschädigt wird [Braakhuis et al., 2002; Slaughter et al., Strong et al., 1984; 1953; Haugerty et al., 1992]. Fernmetastasen treten erst im späteren Krankheitsverlauf auf [Werner, 1997].

Zur Verbesserung der Prognose ist eine frühzeitige Diagnose der Tumoren von größter Bedeutung [Silvermann, 1988; Kuropkat et al., 2002]. Allerdings stehen dem untersuchenden Arzt bislang keine ausreichenden diagnostischen Mittel zu einer verbesserten Frühdiagnose von Erst- bzw. Zweitkarzinomen zur Verfügung. Sowohl bei der endoskopischen Untersuchung der im Kopf-Hals-Bereich gut zugänglichen Regionen als auch durch bildgebende Verfahren können derartige Befunde teilweise nicht oder nur unvollständig erkannt werden. Dysplasien oder Frühkarzinome im Sinne eines Carcinoma-in-situ imponieren oft nur als extrem flache Schleimhautveränderungen und weisen selten typische morphologische Tumorcharakteristika auf. Darüber hinaus stellt sich nach bereits erfolgter Primärtherapie häufig das Problem, dass bei den Nachsorgeuntersuchungen Rezidive und Neubildungen von Narbengewebe oder ödematöser Schleimhaut nur schwer zu differenzieren sind [Hilal, 1994]. Ausreichend zuverlässige Tumormarker, wie beispielsweise das Prostata-Spezifische-Antigen (PSA) für das Prostatakarzinom, sind für Karzinome der oberen Luft- und Speisewege derzeit nicht bekannt [Werner et al., 2002a]. Aus den genannten Gründen sucht man nach zusätzlichen diagnostischen Hilfsmitteln, die eine frühzeitige Unterscheidung zwischen normalem und malignem Gewebe ermöglichen.

Ein mögliches erfolgversprechendes Verfahren zur Früherkennung von Karzinomen an der Schleimhaut stellt die Fluoreszenzendoskopie dar. Unter der Gewebefluoreszenz versteht man die Eigenschaft bestimmter Gewebearten, unter Bestrahlung mit Licht-, Röntgen- oder Kathodenstrahlen durch Energietransfer selbst Licht abzustrahlen, d.h. zu fluoreszieren. Es werden prinzipiell zwei Arten von Fluoreszenz unterschieden: die Autofluoreszenz und die Farbstoff-induzierte Fluoreszenz.

Das Prinzip der Autofluoreszenz ist seit vielen Jahrzehnten bekannt [Policard, 1924; Ronchese, 1954; Ghadially, 1960; Ghadially et Neish 1960]. Eine große Rolle spielen sogenannte Fluorochrome, also Stoffe, die sich durch Lichteinfluss zur Autofluoreszenz anregen lassen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass deepithelisiertes Gewebe, wie es auch bei ulzerierenden Tumoren vorkommt, besonders stark fluoresziert. Diese Eigenschaft versucht man diagnostisch zu nutzen, um tumoröses Gewebe möglichst frühzeitig erkennen zu können [Malzahn, et al., 2002].

Im Gegensatz zur Autofluoreszenz wird bei der Farbstoff-induzierten Fluoreszenz eine Erhöhung der Lichtempfindlichkeit des Gewebes durch exogene Zufuhr von chemischen Stoffen, sog. Photosensibilisatoren, erreicht. Dieser Vorgang wird als Photosensibilisierung bezeichnet. Für die Photosensibilisierung geeignete Substanzen sollten eine hohe Lichtabsorption im roten und infraroten Bereich besitzen, sich selektiv im Tumorgewebe anreichern, eine geringe Toxizität für den Organismus aufweisen und zudem in Kombination mit der Lichtwirkung zu einer Zellzerstörung führen [Abels et al., 2000]. Von besonderem klinischen Interesse sind dabei die Photosensibilisatoren, die eine transiente tumorselektive Photosensibilisierung aufweisen und damit eine selektive Markierung maligner Tumorgewebe herbeiführen können.

Die photosensibilisierende Wirkung von Farbstoffen ist schon seit mehr als 100 Jahren bekannt. Von Tappeiner und Jesionek berichteten bereits im Jahre 1903 über erste Erfahrungen zur Markierung von Hauttumoren durch Eosin- und Magdalenrot-Sensibilisierung mit nachfolgenden Versuchen der Zellzerstörung durch Sonnen- bzw. Bogenlampenlichtbestrahlung [von Tappeiner et Jesionek, 1903]. Vor allem in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts wurden eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Untersuchungen durchgeführt, wobei vor allem Hämatoporphyrinderivate als Farbstoffe zur Photosensibilisierung eingesetzt wurden [Auler et Banzer, 1942; Figge et al. 1948; Lipson et al., 1961; Rassmussen-Taxdal et al., 1955]. Der wesentliche Nachteil der Hämatoporphyrinderivate ist, dass die Tumorselektivität gering ist und es zu einer generalisierten Photosensibilisierung des Organismus kommt. Insbesondere aufgrund der Photosensibilisierung der gesamten Haut mussten die Patienten wochenlang jegliche Lichtexposition meiden [Leonhard et Beck, 1971]. Aufgrund der genannten, zum Teil lebensbedrohlichen Nebenwirkungen und der zudem geringen Absorption im roten Spektralbereich wurden verbesserte Photosensibilisatoren entwickelt und bei verschiedenen Tumorentitäten und –lokalisationen eingesetzt [Fan et al., 1997; Gluckmann et al., 1986; Unsöld, 1995; von Röder, 1993].

Eine neue, sehr erfolgversprechende Substanz stellt die 5-Aminolävulinsäure (ALA) dar. Die ALA ist das erste Syntheseprodukt der Hämbiosynthese. Durch exogene Zufuhr von ALA kommt es unter Umgehung des physiologischen Feedback-Mechanismus zur intrazellulären Akkumulation von endogen gebildetem

Protoporphyrin IX (PpIX). Der Farbstoff PpIX reichert sich selektiv in maligne transformierten Zellen an und fluoresziert unter Anregung mit blauem Licht stark rot [Kennedy et Pottier, 1992].

Erste Hinweise auf eine mögliche Tumorselektivität von ALA ergaben sich aus Zellkulturstudien mit Leukämiezellen [Malik et Luagaci, 1987]. Der große Unterschied zu den Hämatoporphyrinderivaten ist, dass ALA lokal appliziert werden kann und damit eine generalisierte Photosensibilisierung mit den oben genannten Nachteilen vermieden werden kann. ALA wurde klinisch erstmals zur Optimierung der Detektion des Harnblasenkarzinoms [Kriegmair et al., 1994] und bei gastrointestinalen Tumoren [Regula et al., 1995] eingesetzt. Inzwischen konnte für diese Tumorentitäten eine höhere Sensitivität der Fluoreszenzendoskopie im Vergleich zur Weißlichtendoskopie (WLE) nachgewiesen werden [Kriegmair et al., 1996; Messmann et al., 1999]. Auch bei malignen Bronchialerkrankungen [Baumgartner et al., 1992 et 1996; Gamarra et al., 2000; Gossner et Ell, 1995; Gossner et al., 1999], in der Neurochirurgie [Stummer et al., 1998], in der Gynäkologie [Hillemanns et al., 1999] sowie bei Tumoren der äußeren Haut [Fritsch et al., 1997; Szeimes et al 2000] erweist sich die ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik als hilfreich für eine bessere Abgrenzung von malignen und prämaligen Veränderungen .

Im Kopf-Hals-Bereich wurde die 5-Aminolävulinsäure erstmalig von Kennedy und Mitarbeitern 1990 zur Untersuchung von malignen Schleimhautveränderungen der Mundhöhle angewandt [Kennedy et al., 1990]. Es gibt bisher nur wenige Literaturmitteilungen für den Bereich der oberen Luft- und Speisewege, wobei diese überwiegend auf die Mundhöhle beschränkt sind und kleinere Patientenkollektive umfassen [Leunig et al., 2000a; Mehlmann et al., 1999; Betz et al., 1997]. Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der Fluoreszenzdiagnostik nach topischer Applikation von 5-Aminolävulinsäure bei malignen Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich ein klinischer Stellenwert zukommt.

2 Fragestellung

Die derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten, sowohl Endoskopie als auch moderne bildgebende Verfahren wie Computertomographie oder Magnetresonanztomographie, sind in der frühzeitigen und sicheren Erkennung von Malignomen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege eindeutig limitiert. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob durch die Protoporphyrin IX induzierte Fluoreszenzendoskopie eine zuverlässige Malignomerkenkung möglich ist und ob dieses Diagnostikverfahren in der klinischen Routine einsetzbar ist.

Der nachfolgenden Untersuchung liegen folgende Fragestellungen zu Grunde:

1. Ist die Fluoreszenzendoskopie zur Karzinomerkenkung geeignet?
2. Kann die Fluoreszenzdiagnostik in die klinische Routine etabliert werden?
3. Ergibt sich dadurch ein diagnostischer und therapeutischer Gewinn bei Kopf-Hals-Tumoren?

3 Patienten und Methoden

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde bei Patienten mit einem histologisch gesicherten Karzinom oder einer malignomverdächtigen Schleimhautveränderung der oberen Luft und Speisewege neben der routinemäßigen Weißlichtendoskopie zusätzlich eine ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik durchgeführt. Bei einem kleinen Teil der Patienten erfolgte zusätzlich eine Autofluoreszenzendoskopie, um einen Vergleich beider Verfahren und deren Stellenwert in der endoskopischen Tumordiagnostik beurteilen zu können. Darüber hinaus wurde die ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik auch bei Patienten mit malignomverdächtigen Veränderungen der Gesichts- und Kopfhaut angewandt, um deren Wertigkeit hinsichtlich der Beurteilung der Tumorgrenzen und damit der Bestimmung der Resektionsgrenzen zu untersuchen.

3.1 Patienten

Es wurde im Zeitraum 07/1999 bis 02/2001 bei 150 Patienten eine Fluoreszenzdiagnostik durchgeführt. Das durchschnittliche Lebensalter betrug 62,5 Jahre, 126 der Patienten waren männlichen, 24 weiblichen Geschlechts. Bei allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung für die Untersuchung vor.

Die Einteilung der Patienten erfolgte entsprechend der Lokalisation der Schleimhaut- oder Hautveränderung (Tab. 1). Im Falle mehrerer Läsionen wurde die größte für die Zuordnung gewählt. Insgesamt wurden acht Gruppen unterschieden: Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, Nasenhaupthöhle (einschließlich Nasopharynx und Nasennebenhöhlen), Tracheobronchialbaum, Gesichts-/Kopfhaut und CUP-Syndrom (carcinoma of unknown primary). Bei der letztgenannten Gruppe handelte es sich um die Patienten mit einer nachgewiesenen Halslymphknotenmetastasierung eines Plattenepithelkarzinoms, bei denen die Endoskopie zur Suche des noch unbekannten Primärtumors erfolgte.

Nach erfolgter Endoskopie und histologischer Untersuchung der entnommenen Gewebeproben wurden die Patienten entsprechend der T-Klassifikation eingeteilt (Tab. 2). Die histologisch als nicht maligne befundeten Veränderungen wurden zu einer

Gruppe („benigne“) zusammengefaßt, wobei auch hier die Zuteilung gemäß der jeweiligen Lokalisationen erfolgte.

Lokalisation	Anzahl der Patienten	Inhalation	Spülung	Salbe
Mundhöhle	20		20	
Oropharynx	31		31	
Hypopharynx	14	14		
Larynx	69	69		
Nasenhaupthöhlen, Nasopharynx und Nasennebenhöhlen	2	2		
Tracheobronchialsystem	4	4		
Gesichts-, Kopfhaut	8			8
CUP	2	2		

Tab. 1: Anzahl der untersuchten Patienten (n=150) gegliedert nach Lokalisation der Läsionen und ALA-Applikationsarten

Lokalisation Anzahl (n)	Cis	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	benigne
Mundhöhle n=20	1	6	6	1	3	3
Oropharynx n=31	2	4	8	7	8	2
Hypopharynx n=14	-	1	5	2	5	1
Larynx n=69	4	22	11	9	5	18
Nasennebenhöhlen, Nasopharynx und Nasenhaupthöhle n=2				1		1
Tracheobronchialbaum n=4	1	1			1	1
Gesichts-, Kopfhaut n=8		4	1			3

Abb. 2: Einteilung der mittels ALAFE (Aminolävulinsäure-Fluoreszenz-Endoskopie) untersuchten Patienten (n=148) gegliedert nach der T-Klassifikation bzw. gutartigen Schleimhaut-/Hautveränderungen. Die zwei Patienten mit einem CUP-Syndrom sind in dieser Tabelle nicht erfaßt

Bei 11 Patienten erfolgte zusätzlich zur ALA-Endoskopie zu einem späteren Zeitpunkt eine Autofluoreszenzendoskopie (Tab. 3). Somit konnten beide Techniken direkt miteinander verglichen werden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um Patienten mit Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx sowie des Larynx und Hypopharynx. Die Autofluoreszenzendoskopie erfolgte im Rahmen der endoskopischen Laserresektion des Tumors. In keinem Fall war dadurch eine wesentliche Verlängerung der Operationsdauer oder gar eine zusätzliche Untersuchung erforderlich.

Lokalisation Anzahl (n)	Cis	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	benigne
Mundhöhle n=4		2	2			
Oropharynx n=2				1		1
Hypopharynx n=2		1	1			
Larynx n=3		1	1			1

Tab. 3: Klassifikation der 11 Patienten, bei denen neben der ALAFE (Aminolävulinsäure-Fluoreszenz-Endoskopie) zusätzlich eine Autofluoreszenzendoskopie durchgeführt wurde

3.2 Methoden

3.2.1 Prinzip der Gewebefluoreszenz

Wird Gewebe durch Lichtenergie angeregt, so kommt es zur Abstrahlung von Fluoreszenzlicht. Die als Autofluoreszenz bezeichnete Lichtemission wird durch die Gewebezusammensetzung selbst bedingt und ist unabhängig von der Verabreichung eines Photosensibilisators. Für den Energietransfer und die Lichtabstrahlung sind besondere Atomgruppen verantwortlich. Eine große Rolle spielen Atomgruppen, die sog. Chromophoren, die hauptsächlich in den zellulären Makromolekülen der Submukosa vorkommen. Dies sind gewebeeigene Fluorochrome, die sich zur Autofluoreszenz anregen lassen, das heißt, nach Stimulation durch Anregungslicht emittieren diese Chromophoren Fluoreszenzlicht.

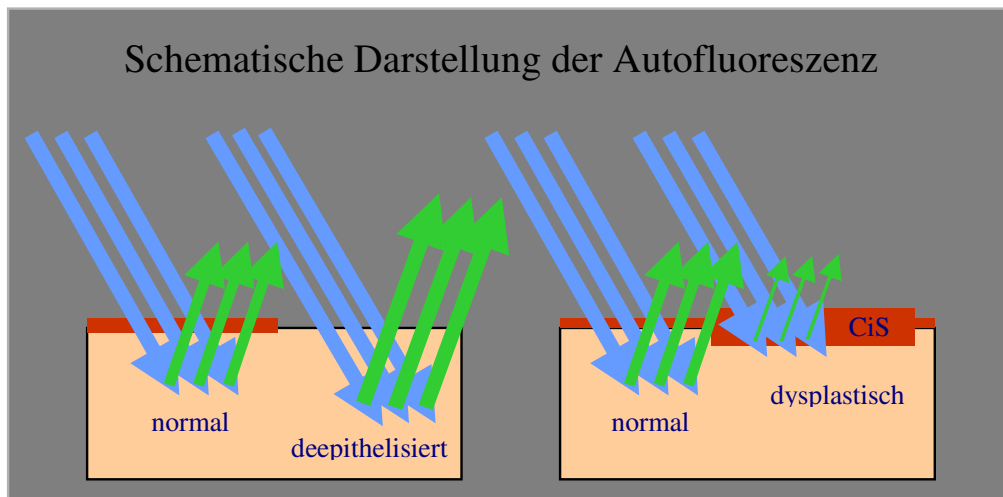


Abb. 1: Prinzip der Autofluoreszenz: Die Bestrahlung der Schleimhaut mit blauem Licht der Wellenlänge $\lambda = 442 \text{ nm}$ bewirkt eine Emission von grünem Fluoreszenzlicht. Deepithelisierte Areale führen im Vergleich zum Normalgewebe zu einer verstärkten Fluoreszenz. Verdickungen der Epithelschicht, beispielsweise durch ein Carcinoma in situ (CiS) bewirken eine Verringerung der grünen Autofluoreszenz durch eine erhöhte Abschwächung sowohl des Anregungs- (blaue Pfeile) als auch des Fluoreszenzlichtes (grüne Pfeile)

Bei der Autofluoreszenzdiagnostik werden die Unterschiede der gewebeeigenen Fluoreszenzeigenschaften (Intensität oder Spektralverlauf der Autofluoreszenz) genutzt, um aufgrund dieser die Dignität bzw. Malignität eines Gewebes zu beurteilen.

Im Gegensatz zur Autofluoreszenz wird bei der Farbstoff-induzierten Fluoreszenzdiagnostik dem zu untersuchenden Gewebe ein Farbstoff zugeführt, der anschließend entsprechend seiner Gewebeakkumulation zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Einen derartigen Farbstoff (Photosensibilisator) stellt die ALA dar.

3.2.2 Aminolävulinsäure (ALA)

Die genaue chemische Bezeichnung des verwendeten Photosensibilisators lautet 5-Amino-4-oxo-Pentansäurehydrochlorid (ALA). Dieser hat die Summenformel $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ (Abb. 2), das Molekulargewicht beträgt $167,59 \text{ g/mol}$. Synonyme sind δ -Aminolävulinsäurehydrochlorid (5-ALS) und δ -Aminolevulinic acid (δ -ALA). Es handelt sich hierbei um ein weißes bis bräunlich-weißes Pulver, welches in Wasser löslich ist. Der Schmelzpunkt liegt zwischen $151\text{-}154 \text{ }^\circ\text{C}$, der pH beträgt $2,2 - 3,2$. Die Substanz ist in einer Konzentration über 99 % als pharmazeutischer Rohstoff erhältlich (Firma medac research GmbH, Hamburg-Wedel) und sollte lichtgeschützt und dicht verschlossen in einem Braunglasgefäß gelagert werden.

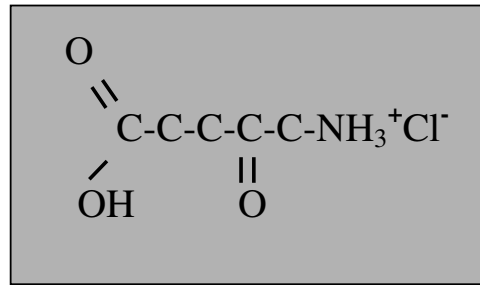


Abb. 2: Strukturformel von 5-Aminolävulinsäure ($\text{C}_5\text{H}_9\text{ClNO}_3$)

Die ALA ist das natürliche Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese, wozu alle kernhaltigen Zellen befähigt sind (Abb. 3). Nach exogener Applikation läßt sich eine vermehrte Anreicherung endogener Porphyrine, insbesondere von Protoporphyrin IX (PpIX) in Zellen epithelialen Ursprungs nachweisen. PpIX ist das entscheidende Fluorochrom, welches während der fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung nachgewiesen wird. Es handelt sich hierbei um einen rotfluoreszierenden Photosensibilisator, der vermehrt in den Tumorzellen akkumuliert.

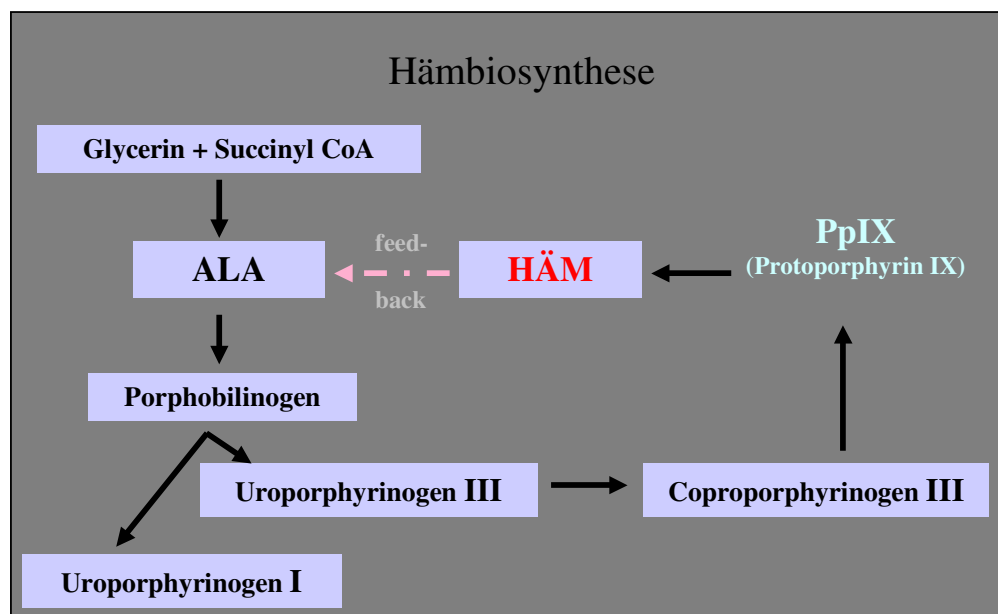


Abb. 3: Schematische Darstellung der Pharmakokinetik der Hämbiosynthese: Im Rahmen der Hämbiosynthese wird fluoreszierendes Protoporphyrin IX (PpIX) physiologisch intrazellulär gebildet, welches in Tumorzellen eine verstärkte Akkumulation aufweist. Durch die Applikation von ALA von außen wird der Feed-back-Mechanismus ausgeschaltet, so daß die selektive Anreicherung von PpIX zusätzlich gesteigert wird

3.2.3 Applikationsformen von ALA

Der Photosensitizer ALA wurde in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich lokal appliziert. Die Art der topischen Applikation von ALA erfolgte entsprechend der Lokalisation der zu beurteilenden Haut- bzw. Schleimhautveränderung.

Orale Applikation (Spülung):

Patienten mit Schleimhautveränderungen im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx spülten für 15 Minuten mit einer 0,4 %igen ALA-Lösung (200 mg in 50ml Mineralwasser gelöst).

Inhalation:

Bei verdächtigen Schleimhautarealen im Bereich des Larynx, des Hypopharynx, des Tracheobronchialsystems sowie der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen inhalierten (Abb. 4) die Patienten 15 Minuten lang die Aerosole (250 mg ALA gelöst in 2 ml NaCl-Lösung) aus einem medizinischen Vernebler (Inhalator MEDAC, Heraeus Med GmbH, Hanau).

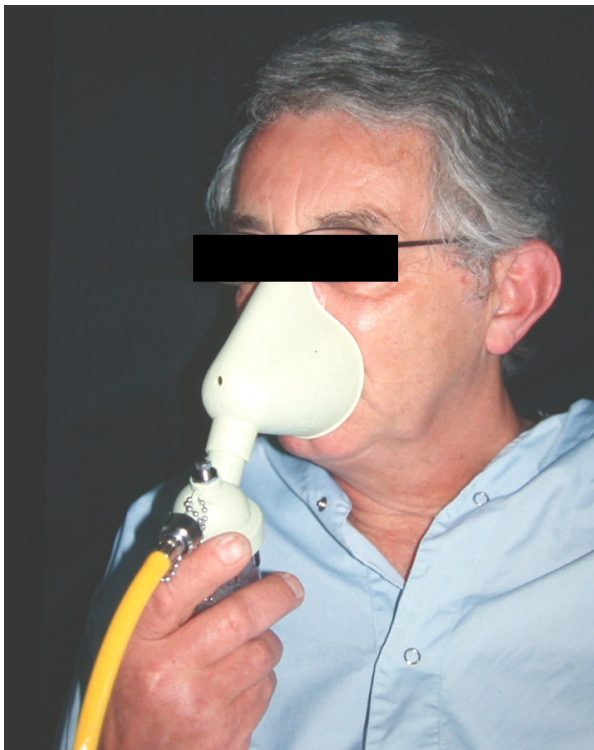


Abb. 4: Patient bei der Inhalation mit ALA

Die Inkubationszeit, d.h. die Zeit zwischen der ALA-Applikation und Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik, betrug sowohl nach Mundspülung als auch nach Inhalation 2-3 Stunden [Leunig et al 2000b].

Topische Applikation im Bereich der Gesichts-/Kopfhaut:

ALA wurde in einer Konzentration von 20 % in eine Salbengrundlage (Psoralen Fettcreme[®], Hermal, Hamburg) eingearbeitet und auf das zu untersuchende Hautareal aufgetragen ($0,2 \text{ g Salbe/cm}^2 = 40 \text{ mg ALA/cm}^2$). Anschließend erfolgte die Anlage eines lichtundurchlässigen Pflasterverbandes mit Aluminiumfolie, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden und die Penetration der aufgetragenen Substanz zu verstärken. Nach einer Einwirkungszeit von zwei Stunden erfolgte die Entfernung der Creme. Die Haut wurde anschließend bis zur Fluoreszenzuntersuchung für weitere zwei Stunden lichtdicht mit einer Aluminiumfolie abgedeckt [Fritsch et al 1998].

3.2.4 Technische Grundlagen (Gerätebeschreibung)

Die Fluoreszenzdiagnostik wurde mit dem sogenannten „D-LIGHT-System“ (Firma KARL STORZ GmbH & Co KG, Tuttlingen, Modell 201333 20) durchgeführt (Abb. 5). Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Xenon-Kurzbogenlampe, welche zur Gewebeanregung Licht im blauen Spektralbereich bei einer Wellenlänge von 375 bis 440 nm emittiert. Die Lichtquelle kann in einem Untersuchungsschritt auch für die üblicherweise durchzuführende Weißlichtendoskopie verwendet werden. Im Weißlichtmodus wird die Lichtleistung auf 10 % der maximal verfügbaren Leistung reduziert, damit der Untersucher vor einer Überstrahlung beim Umschalten vom Fluoreszenz- auf den Weißlichtmodus geschützt wird.

In der Lichtquelle integriert ist ein sogenannter Anregungsfilter. Dieser ermöglicht eine hohe Lichttransmission im violetten Spektralbereich bei weitgehender Blockung des Lichtes des restlichen sichtbaren Spektralbereiches. Der Anregungsfilter ist in der Lichtquelle auf einem Filterrad montiert, so daß eine einfache Umschaltmöglichkeit zwischen Auto- bzw. ALA-Fluoreszenz (ALAF) sowie Weißlichtmodus besteht. Das Umschalten kann sowohl über einen Hand-, als auch über einen Fußschalter ohne Zeitverzögerung erfolgen. Über ein speziell auf die Fluoreszenzendoskopie abgestimmtes Fluidlichtleiterkabel (Firma KARL STORZ GmbH & Co KG, Tuttlingen,

Modell 495 FS) wird das Weißlicht- bzw. Fluoreszenzlicht mit besonders guter Transmission im kurzwelligen Spektralbereich zur Endoskopoptik übertragen.



Abb. 5: Untersuchungseinrichtung zur Fluoreszenzendoskopie (Firma KARL STORZ GmbH & Co KG, Tuttlingen) mit Monitor, Ausschnittsvergrößerung der Video-Kamera, Lichtquelle (D-LIGHT-System) sowie des Videorekorders

Die Betrachtung der Fluoreszenz ist nur möglich, wenn ein großer Teil des Anregungslichtes von einem BeobachtungsfILTER geblockt wird. Bei der ALA-induzierten Fluoreszenzendoskopie reduziert der FILTER das vom Gewebe diffus zurückgestreute blaue Anregungslicht, läßt jedoch gleichzeitig das rote Fluoreszenzlicht transmittieren. Der Kontrast zwischen reflektiertem blauen Licht (normales Gewebe) und rot fluoreszierendem malignem Gewebe wird dadurch verstärkt (Abb. 6).

Der gelbe BetrachtungsfILTER (Modell OG 515 und GG 495 bzw. Modell AF, sowie alle weiteren, unten genannten FILTER, Optiken und Kamera, Firma KARL STORZ GmbH & Co KG, Tuttlingen) musste bei den initial verwendeten lichtstarken starren 0°-Optiken (Hopkins Geradeausoptik 10318 B) manuell auf das Okular aufgesetzt werden. Hierdurch wurde bei der Bilddokumentation eine nicht vermeidbare minimale Unschärfe verursacht. Später wurden starre Optiken (Modell 10320 AP) mit bereits integriertem BeobachtungsfILTER verwendet, wobei am Okular der entsprechende FILTER

für den Weißlicht-, Autofluoreszenz- oder ALA-Modus gewählt werden konnte (Abb. 7 b, c, d). Ein flexibles Endoskop mit ebenfalls integriertem Beobachtungsfilter (Bronchofiberskop 11004 BI) wurde in Ergänzung zum starrem Instrumentarium, insbesondere bei der Tracheobronchoskopie, verwendet (Abb. 7 a).

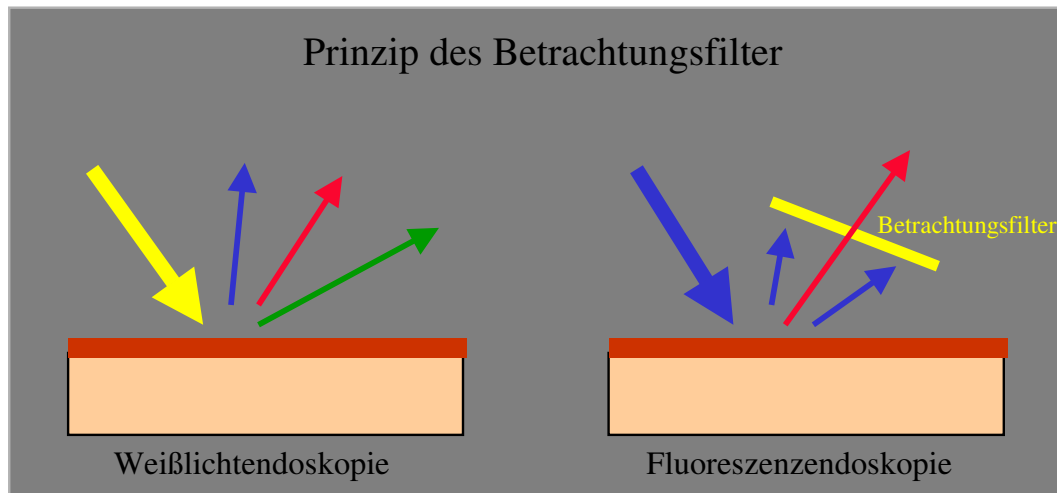


Abb. 6: Schematische Funktion der Betrachtungsfilter: Bei der Endoskopie im Weißlichtmodus wird das Licht (dicker gelber Pfeil) vom Gewebe diffus in jeder Wellenlänge zurückgestreut. Die Fluoreszenzendoskopie erlaubt über das monochromatische Anregungslicht die optimierte Visualisierung der informationstragenden Fluorochrome. Durch die Zuhilfenahme eines geeigneten Beobachtungsfilters (gelber Balken) wird das monochromatische Anregungslicht (dicker blauer Pfeil) vom Fluoreszenzlicht abgetrennt, so daß dieses isoliert betrachtet werden kann

Die Visualisierung der Fluoreszenzbilder erfolgt über eine spezielle Drei-Chip-Carged Coupled Device (CCD)-Kamera (Tricam[®] SL pal, Modell 202220 20 PAL). Bei den CCD-Kameras wird das Lichtsignal über einen Mikrochip in ein elektronisches Signal umgewandelt. Über die drei CCD-Sensorchips wird für jede der drei Grundfarben das Bild in drei Farbauszüge zerlegt. Der Blau-Kanal registriert vornehmlich das zurückgestreute Anregungslicht, der Rot-Kanal die Porphyrinfluoreszenz. Die in jedem Pixel erzeugten freien Elektronen werden über eine gewisse Zeit (z.B. 1/50 s) gesammelt und dann aufgelesen. Der Kameracontroller wandelt diese Elektronen in ein zu ihrer Menge proportionales Spannungssignal und damit in eine entsprechendes Farbbild am Monitor um. Die Dokumentation der erhobenen Endoskopiebefunde erfolgte mittels einer kontinuierlichen Videoaufzeichnung (Panasonic DVCPRO AJ-D650E, Panasonic Broadcast Europe GmbH, Wiesbaden).

Für einen optimalen Kontrast zwischen fluoreszierendem und nichtfluoreszierendem Gewebe weisen das zurückgestreute Anregungslicht und das Fluoreszenzlicht vergleichbare Intensitäten auf.

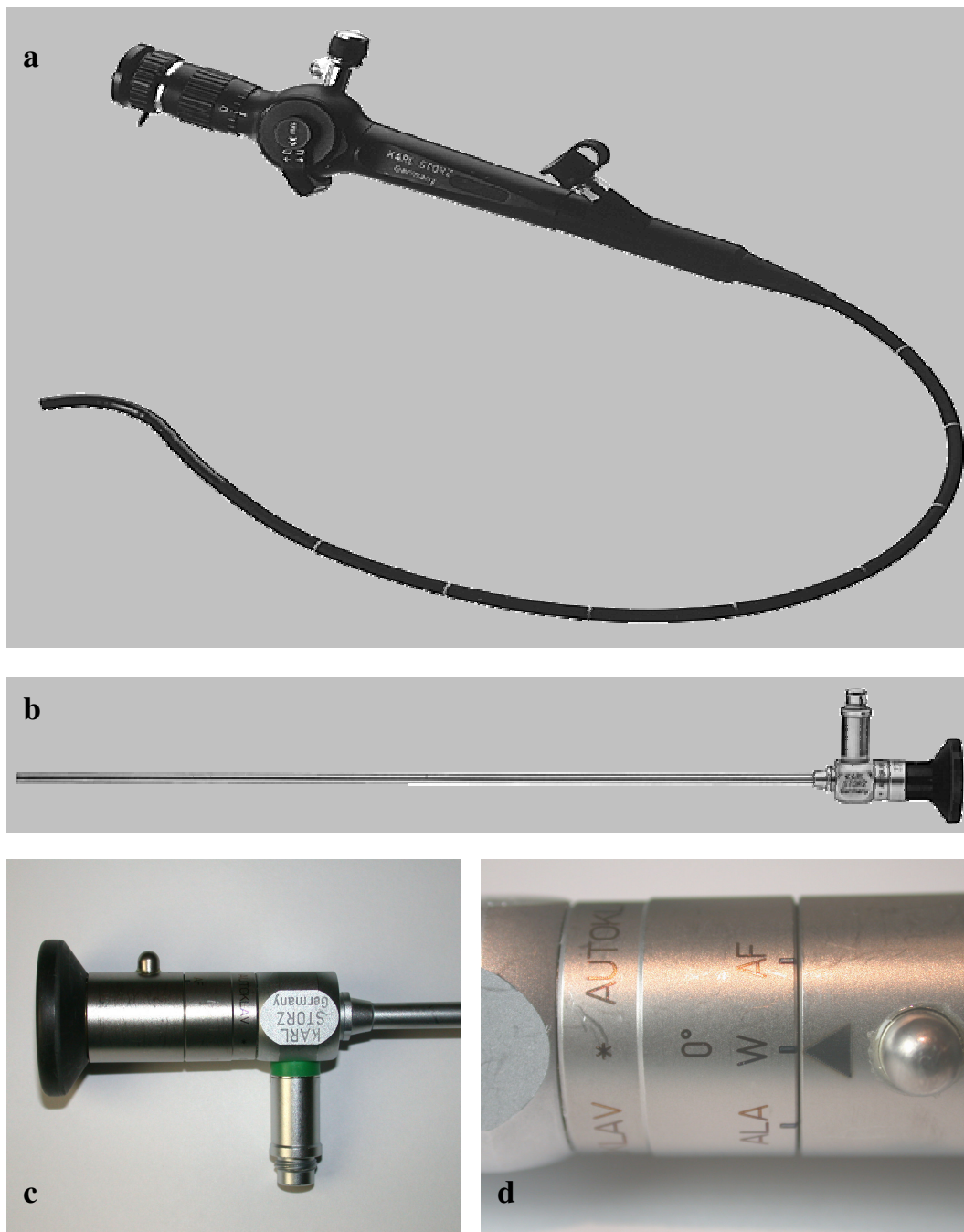


Abb. 7: Flexible (a) und starre (b) Optik zur Fluoreszenzendoskopie mit Vergrößerung des Handstückes der starren Optik (c). In die flexible und starre Optik integriert ist ein Filtersystem, das ein Umschalten auf Weißlicht, Autofluoreszenz oder ALA-Fluoreszenz ermöglicht. Vergrößerung des Handstückes der starren Optik (c, d), jeweils Firma KARL STORZ GmbH & Co KG, Tuttlingen

3.2.5 Untersuchungsablauf

3.2.5.1 Untersuchungsablauf bei Schleimhautveränderungen des oberen Aerodigestivtraktes

Etwa zwei Stunden vor dem geplanten Untersuchungszeitpunkt erfolgte die Applikation des Photosensitizers (ALA) mittels Mundspülung oder Inhalation. Die Zuordnung des jeweiligen Patienten für eine bestimmte Applikationsart erfolgte nach klinischen Gesichtspunkten. Die Fluoreszenzendoskopie erfolgte im Rahmen der routinemäßig durchzuführenden diagnostischen Panendoskopie (Abb. 8). Diese beinhaltet eine endoskopische und mikroskopische Untersuchung von Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, Oesophagus sowie Tracheobronchialsystem in Allgemeinanästhesie. Sie dient der histologischen Abklärung bei Malignomverdacht, der Ausdehnungsbestimmung einer Schleimhautläsion und damit auch der Therapiefestlegung sowie des Ausschlusses weiterer maligner Schleimhautveränderungen.

Während der endoskopischen Untersuchungen wurde der OP-Raum stets abgedunkelt. Um individuelle Fehler zu minimieren, wurden die Endoskopien bei allen Patienten von nur zwei erfahrenen Untersuchern vorgenommen.

Die initiale Endoskopie erfolgte zunächst im Fluoreszenzmodus und anschließend im Weißlichtmodus, um so ein vorzeitiges Zerstören des Fluoreszenzfarbstoffes PpIX (Photobleaching) durch das hochenergetische Weißlicht zu vermeiden. Nach Video-Dokumentation der fluoreszierenden Schleimhautareale wurde die Untersuchung im Wechsel mit dem Weißlichtmodus bei geringer Lichtintensität fortgesetzt, so daß jeweils ein guter Vergleich zwischen den Endoskopiebildern in den unterschiedlichen Modi möglich war.



Abb. 8: Bild aus dem Operationssaal während der Durchführung einer Fluoreszenzendoskopie in Allgemeinanästhesie

Nach der sorgfältigen Endoskopie und Dokumentation der Fluoreszenz- und Weißlichtbildbefunde erfolgten die Gewebeprobeentnahmen. Es wurden zur histologischen Diagnosebestimmung und Festlegung der Tumorausdehnung routinemäßig mindestens 3 Biopsien entnommen (Abb. 9).

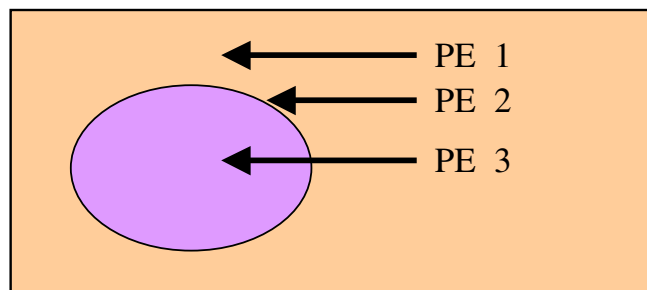


Abb. 9 : Schematische Darstellung der Probeentnahme aus der benachbarten gesunden Schleimhaut (PE 1), aus dem Tumorrandbereich (PE 2) und aus dem Tumorzentrum (PE 3)

Mit kaltschneidendem Instrumentarium wurden im Fluorezenzlichtmodus jeweils aus dem Tumorzentrum, aus dem sichtbaren Tumorrandbereich und dem angrenzenden Normalgewebe Biopsien gewonnen. Darüber hinaus erfolgten Gewebeprobeentnahmen in den Schleimhautarealen, die entweder in Fluoreszenzlicht oder Weißlicht malignomverdächtig erschienen. Die histologische Untersuchung der entnommenen Biopsien erfolgte routinemäßig im Institut für Pathologie der Philipps-Universität zu Marburg (Direktor: Herr Prof. Dr. R. Moll).

Um eine genaue Korrelation zwischen Fluoreszenzbefund und histologischem Ergebnis herzustellen, wurde die Fluoreszenzintensität der biopsierten Schleimhautareale entsprechend der Einteilung nach Leunig et al. [Leunig et al., 2000a] als stark positiv (F++), schwach positiv (F+) oder nicht vorhanden (F-) bestimmt. Zur Ermittlung der Sensitivität und der Spezifität wurden Karzinome und In-situ-Karzinome als bösartig bewertet, mittelgradige und schwach dysplastische Areale sowie gesunde Schleimhaut wurden als gutartig klassifiziert.

3.2.5.2 Untersuchungsablauf bei Veränderungen der Kopfhaut

Die ALA wurde vier Stunden vor dem geplanten Untersuchungszeitpunkt topisch appliziert. Die Untersuchung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Endoskopietechnik mit identischem Instrumentarium in einem nahezu komplett abgedunkelten Raum. Die klinisch suspekten Hautveränderungen wurden primär im Fluoreszenzmodus inspiziert. Anschließend wurde die umgebende, mit Farbstoff sensibilisierte Haut auf weitere Areale mit verstärkten Lichtemissionen im roten Spektralbereich untersucht.

Neben dem Fluoreszenzbild wurde ein deckungsgleiches klinisches Weißlichtbild mit Hilfe der CCD-Kamera dokumentiert. Zunächst erfolgte im Fluoreszenzbild die farbliche Markierung der sich hier darstellenden Tumorränder auf der Haut. Anschließend wurden die klinisch erscheinenden Tumorränder im Weißlichtmodus mit einer anderen Farbe markiert. Um eine Verfälschung der Befunde zu vermeiden, erfolgte erst nach der Tumormarkierung die Lokalanästhesie. Der Hauttumor wurde letztlich entsprechend der klinischen Tumorgößen mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand reseziert und auf Kork entsprechend der Lokalisation aufgespannt. Bei der anschließend durchgeführten Randschnittentnahme wurden die im

Fluoreszenzlicht über die im Weißlicht hinausragenden suspekten Hautareale gesondert mit einer Nadel markiert. Postoperativ wurde den mit dem Photosensitizer behandelten Patienten empfohlen, die betreffenden Hautareale für 24 Stunden nicht der direkten Sonneneinstrahlung auszusetzen. Das histologische Ergebnis wurde mit dem Fluoreszenzbild und dem Weißlichtbild korreliert.

4 Ergebnisse:

4.1 Fluoreszenz-Ergebnisse

Es kamen bei allen untersuchten Patienten die in der Weißlichtendoskopie (WLE) sichtbaren Schleimhautveränderungen auch bei der ALA-induzierten Fluoreszenz-Endoskopie (ALAFE) zur Darstellung (Abb. 10-16). Endoskopisch zeigten die tumorveränderten Areale eine typische rote Fluoreszenz im Gegensatz zu dem grün-bräunlich erscheinenden gesunden Gewebe. Durch die ALAFE war somit ein besserer Kontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe gegeben. Der beste Fluoreszenzkontrast wurde 1-3 Stunden nach ALA-Applikation erzielt.

In einigen Fällen konnte durch die ALAFE eine exaktere Darstellung von Tumorausläufern und -grenzen erreicht werden als dies in der WLE allein möglich war (Abb. 10,14-16). Dies ließ sich auch histologisch bestätigen. Bei 14 Patienten (dies entspricht 9,4 %) konnten durch die Fluoreszenzmarkierung zusätzliche Schleimhautveränderungen detektiert werden, die mit der WLE allein nicht erkannt worden wären. Es handelte sich in 10 Fällen um Leukoplakien (Dysplasie Grad II), bei 2 Patienten um ein Carcinoma in situ und in einem Fall sogar um ein kleines invasives Plattenepithelkarzinom. Mittels der ALAFE konnte bei einem Patienten ein synchrones Zweitkarzinom des Oesophagus diagnostiziert werden.

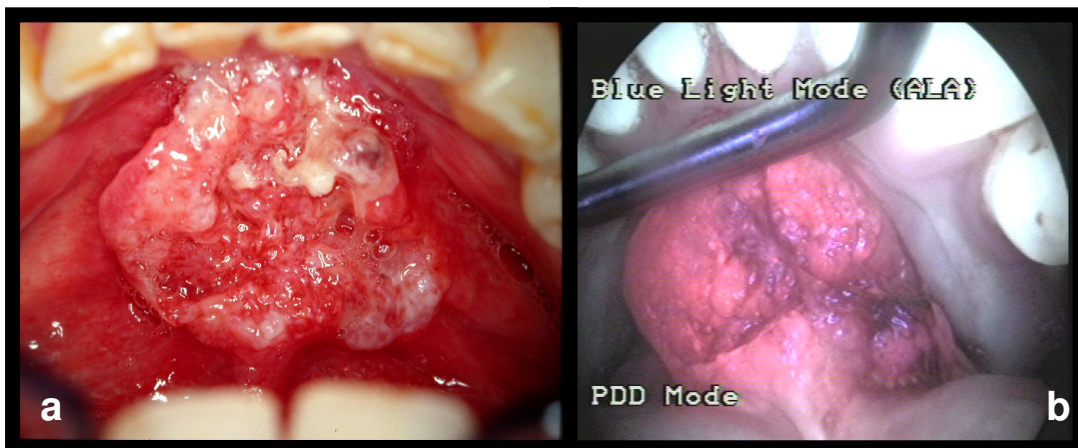


Abb. 10: Median gelegenes Plattenepithelkarzinom des Mundbodens (a). In der ALAFE (b) zeigt sich eine klare Kontrastierung des exophytischen Tumors. Der Alveolarkamm ist nicht tumorinfiltriert

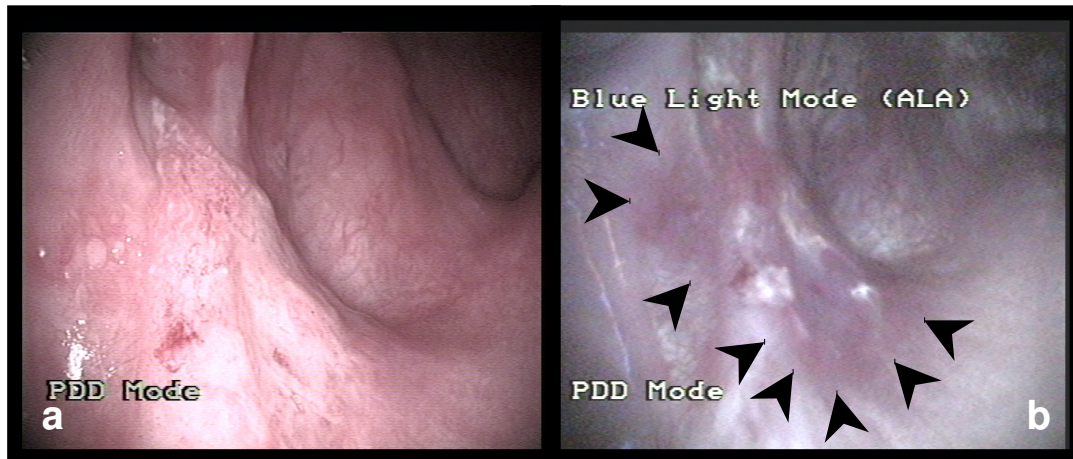


Abb. 11: Plattenepithelkarzinom des vorderen Gaumenbogens links (a). Der Tumor und seine Grenzen (◄) stellt sich zum Normalgewebe in der ALAFE (b) deutlich besser dar

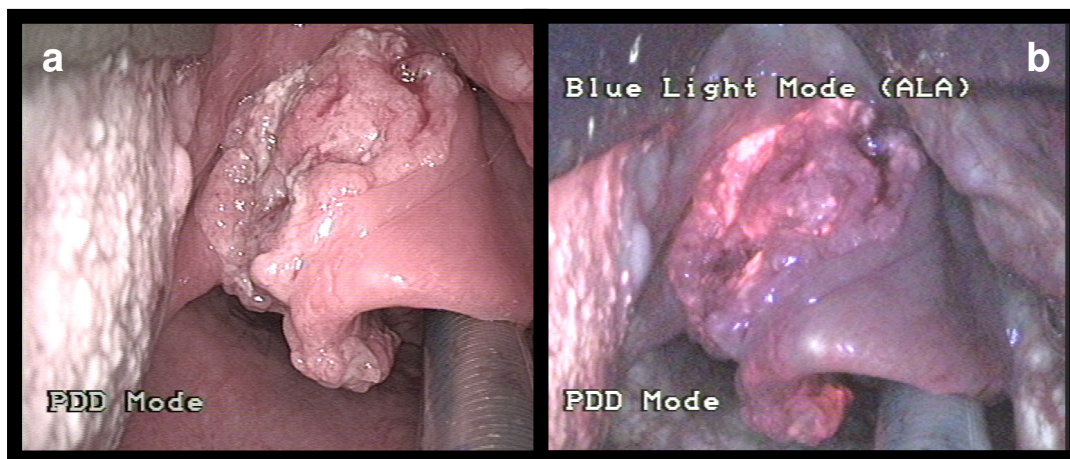


Abb. 12: Plattenepithelkarzinom der Epiglottis unter Weißlichtausleuchtung (a) und ALAFE (b). Es zeigt sich ein deutlicher Rotfluoreszenzkontrast zwischen Tumor und angrenzendem Normalgewebe

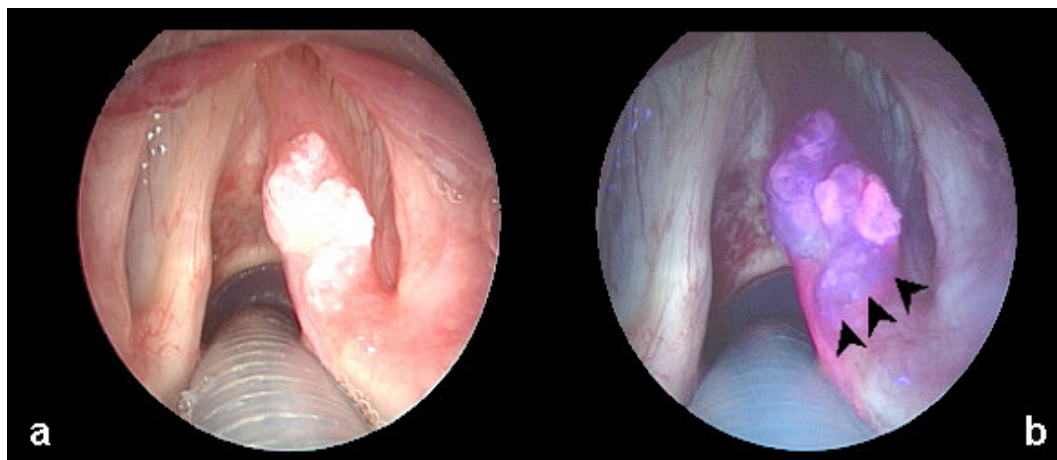


Abb. 13: T1a-Stimmrippenkarzinom rechts (a). In der ALAFE (b) werden durch die Rotfluoreszenz die dorsalen Tumorgrenzen (◄) besser dargestellt. Die linke Stimmrippe ist unauffällig

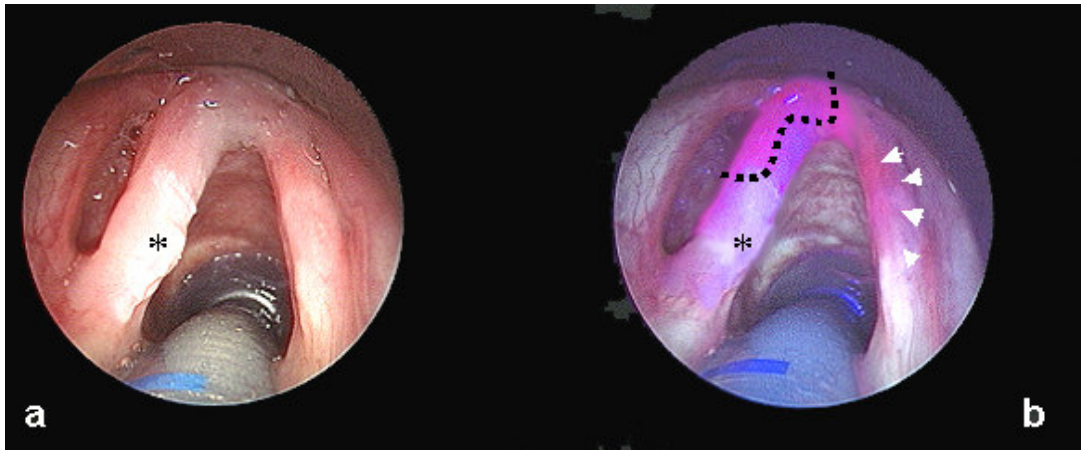


Abb. 14: Schwere chronische Laryngitis mit histologischem Nachweis eines Carcinoma in situ beider Stimmlippen. Im Gegensatz zur WLE (a) wird der Befall der rechten Stimmlippe (◄) erst in der ALAFE (b) sichtbar. Auch im Bereich der vorderen Kommissur (●●●●) ist eine bessere Abgrenzung möglich. Bei der weißlichen Veränderung des mittleren und hinteren Stimmlippendrittels links handelte es sich um eine Leukoplakie ohne Dysplasie (*)

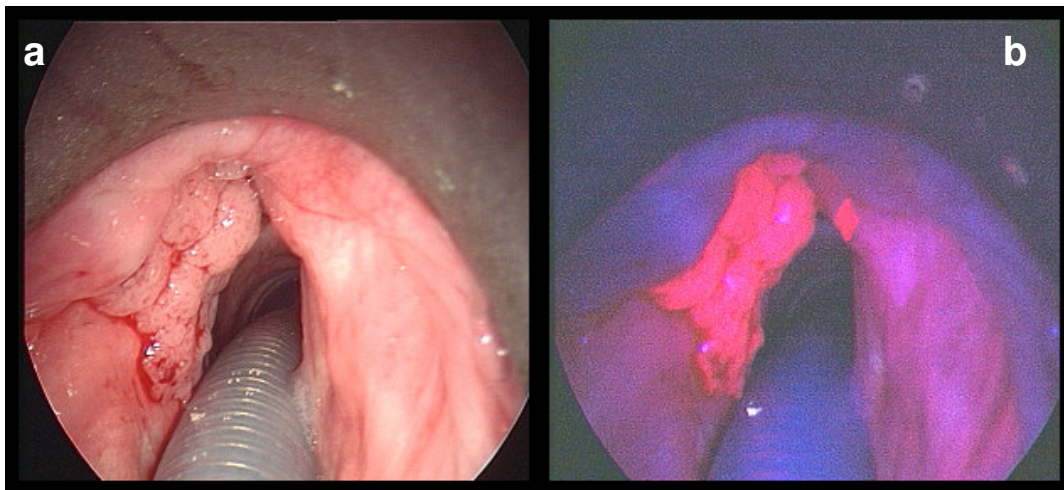


Abb. 15: Karzinom der linken Stimmlippe mit flächigem Wachstum bis auf die Taschenfalte. In der ALAFE (b) zeigt der Tumor eine kontrastreiche Rotfluoreszenz. Im Gegensatz zur WLE (a) stellt sich zusätzlich eine Läsion der rechten Taschenfalte dar. Histologisch handelte es sich um eine mäßiggradige Dysplasie

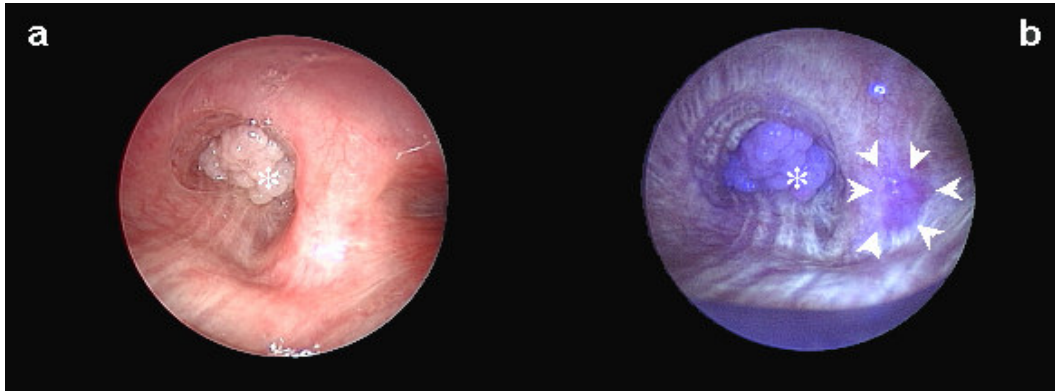


Abb. 16: Endoskopisches Bild (a) einer rezidivierenden respiratorischen Papillomatose (*) mit Verschluss des rechten Mittellappenbronchus. In der ALAFE (b) lässt sich ein weiteres, in der WLE nicht erkennbares Schleimhautareal (◄) detektieren. Die histologische Begutachtung ergab einen fokalen Übergang in ein Carcinoma in situ

Im Bereich der Gesichts- und Kopfhaut ließen sich im Fluoreszenzmodus die Hautveränderungen gut darstellen. Auffällig war die zunächst starke Fluoreszenz des gesamten mit ALA-Creme behandelten Hautareals. Unter dem Anregungslicht kam es im weiteren Untersuchungsverlauf, nach ca. 30 bis 60 Sekunden, zum Abblässen des behandelten Hautbereiches, wobei die malignomverdächtigen Hautareale aber weiterhin fluoreszierten und sich somit gut abgrenzen ließen. Es konnte keine Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und den histologischen Ergebnissen hergestellt werden. So zeigten die untersuchten Basaliome, Spinaliome, senilen Elastosen und aktinischen Keratosen keine klar erkennbaren Fluoreszenzunterschiede. Es kam im Fluoreszenzbild zu einer deutlichen Demarkierung der Hautläsionen und damit zu einer besseren Abgrenzbarkeit zur benachbarten gesunden Haut (Abb. 17 und 18). Bei einem Patienten mit multiplen senilen Elastosen und aktinischen Keratosen der unbehaarten Kopfhaut ließen sich mittels der ALAF über die klinisch sichtbaren Veränderungen weitere Läsionen nachweisen.

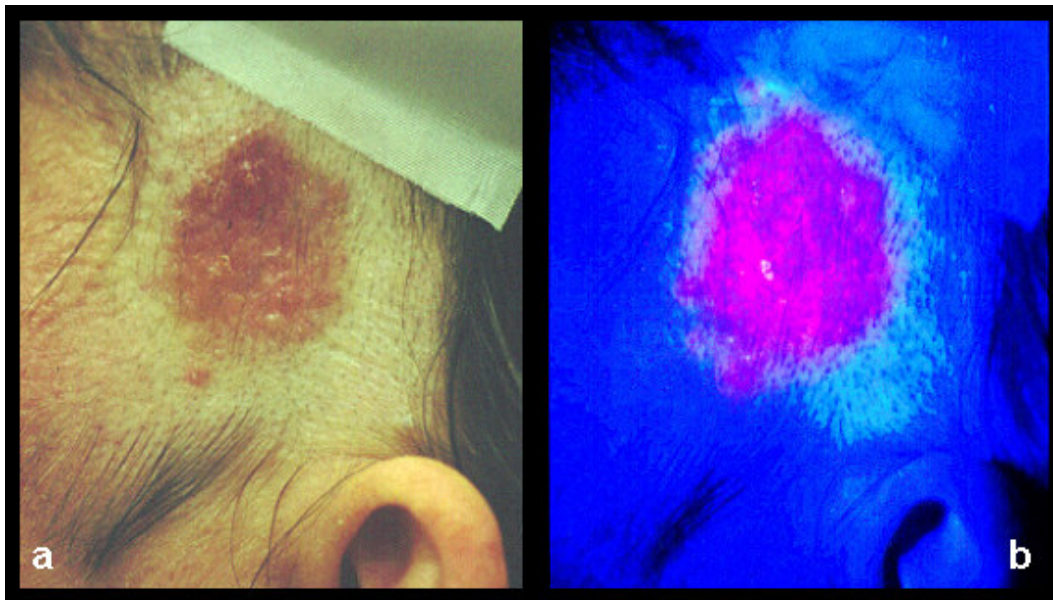


Abb. 17: Basalzellkarzinom der linken Schläfe in der WLE (a) und ALAFE (b). Die Tumorgrenzen stimmen histopathologisch mit denen der klinisch sichtbaren Fluoreszenz überein. Der weißliche Saum entspricht durch den Okklusionsverband aufgeweichtem Keratin

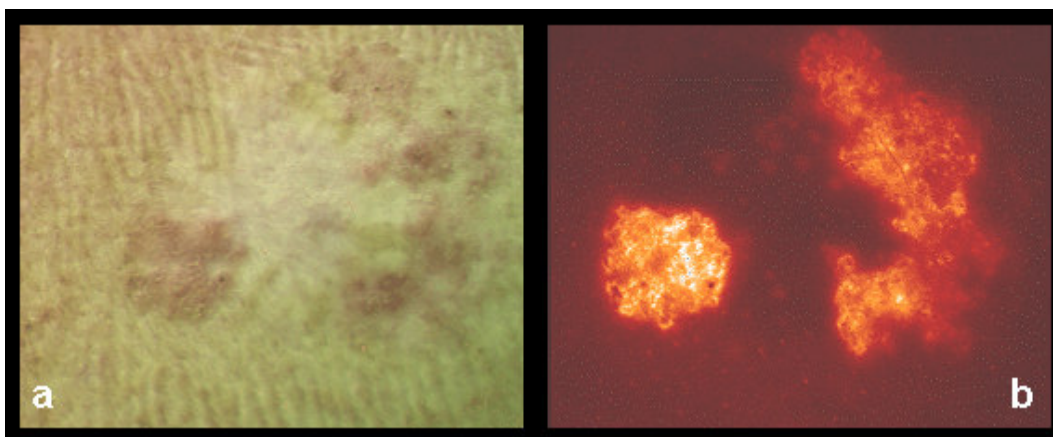


Abb. 18: Basalzellkarzinom der linken Wange im Weißlichtmodus bei Zustand nach vorausgegangener Kryotherapie (a). Das ganze Ausmaß des Residualtumors lässt sich im Fluoreszenzbild (b) nach topischer ALA-Applikation klar erkennen

Die histologische Untersuchung ergab bei insgesamt 170 Läsionen eine nicht-maligne Diagnose. Es handelte sich um Leukoplakien, Hyperplasien oder Keratosen an der Schleimhaut und benigne Hautveränderungen. Besonders hervorzuheben ist die benigne respiratorische Papillomatose im Bereich der oberen Luftwege. Die Papillome zeigen

eine starke Rotfluoreszenz und demarkieren sich dadurch gegenüber dem umgebenden Normalgewebe sehr deutlich (Abb. 19).

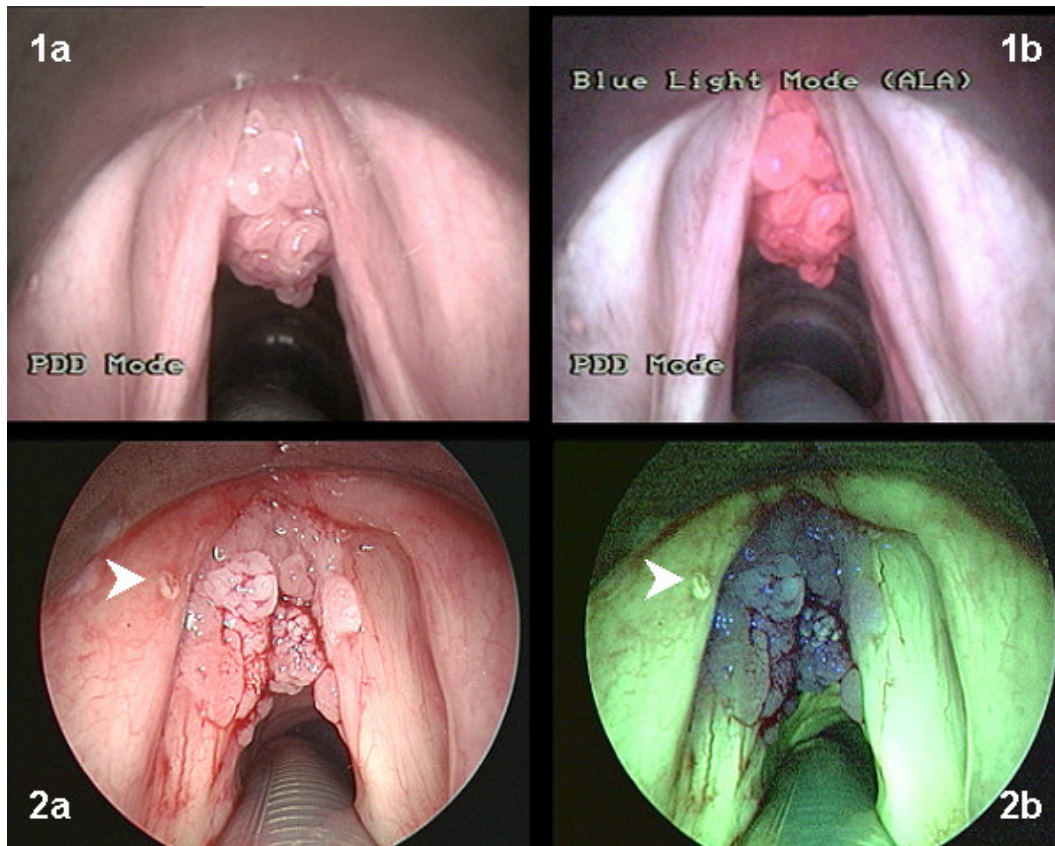


Abb. 19: Endoskopische Befunde bei rezidivierender respiratorischer Papillomatose mit Befall des Larynx. Das in der vorderen Kommissur lokalisierte solitäre Papillom (1a) zeigt in der ALAFE (1b) eine charakteristische Rotfluoreszenz und Demarkierung. Abbildung 2a zeigt den weißlichtendoskopischen Befund einer Papillomatose mit Befall beider Stimmlippen, der vorderen Kommissur und subglottisch. In der AFE (2b) zeigt sich eine bessere Abgrenzbarkeit der erkrankten Schleimhautareale. Es wird auch deutlich, dass das mit einem Pfeil (◄) markierte Areal keinem Papillom entspricht

4.2 Histopathologie

In die Auswertung und Berechnung der Korrelation von Fluoreszenz und histopathologischen Ergebnissen wurden nur die Patienten mit Läsionen von Mundhöhle und Oropharynx sowie Larynx und Hypopharynx einbezogen. Für andere Organlokalisationen waren die Fallzahlen zu gering.

Es wurden bei 134 Patienten insgesamt 313 Gewebeproben entnommen und ausgewertet. Pro Patient wurden unterschiedlich viele Gewebeproben entnommen. Dies erklärt sich dadurch, dass insbesondere bei gut sichtbaren und gut zugänglichen Tumoren der Mundhöhle und des Oropharynx teilweise schon ein histologischer Karzinomnachweis vorlag. Andererseits wurden bei klinisch nicht eindeutigem Malignomverdacht im Larynx zur Vermeidung von funktionell beeinträchtigenden Narben keine Gewebeproben aus dem Randbereich bzw. aus der gesunden Schleimhaut entnommen. Leukoplakien mit gering- bis mäßiggradiger Dysplasie (Abb. 20) sowie normale Schleimhaut wurden als benigne, Carcinoma in situ (Abb. 21) und mikroinvasive Karzinome (Abb. 22) als maligne gewertet.

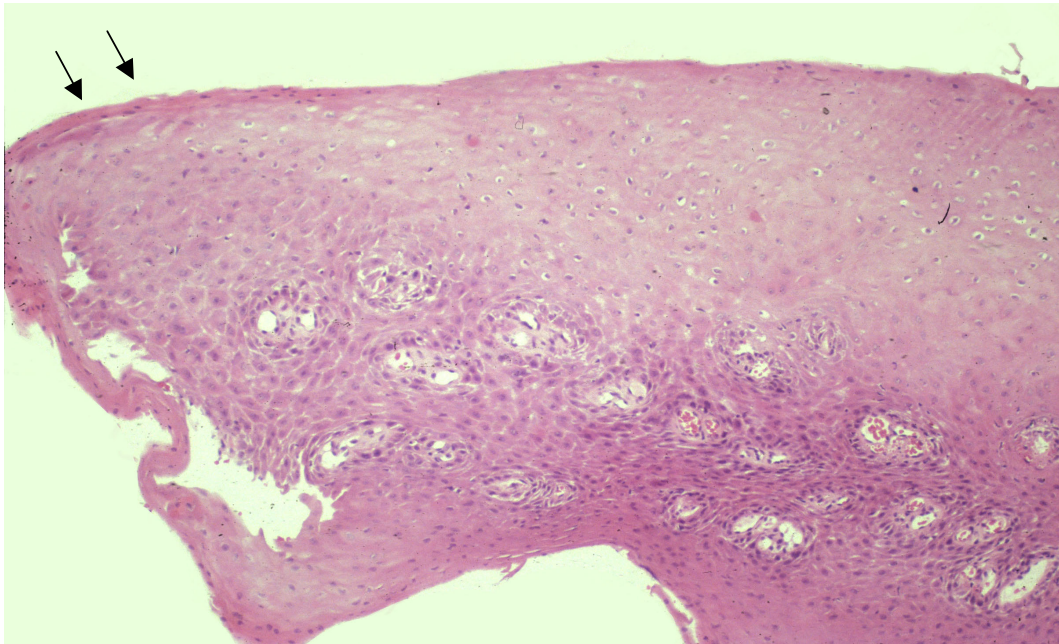


Abb. 20: Flache Leukoplakie ohne Dysplasie der linken Stimmlippe. Das Epithel ist verbreitert, an der Oberfläche zeigen sich Parakeratosezellen (→); HE-Färbung, x 100

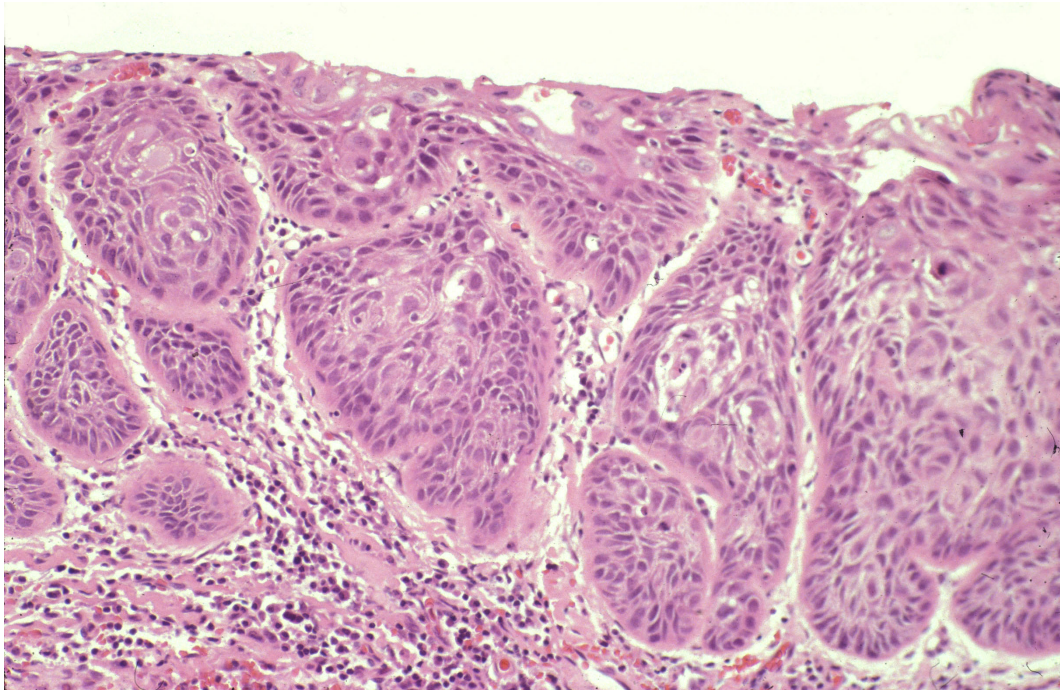


Abb. 21: Carcinoma in situ des Oropharynx. Die Schichtung des Plattenepithels ist aufgehoben, die Zellen sind größer und weisen Unregelmäßigkeiten auf. Die Basalmembran ist intakt; HE-Färbung, x 200

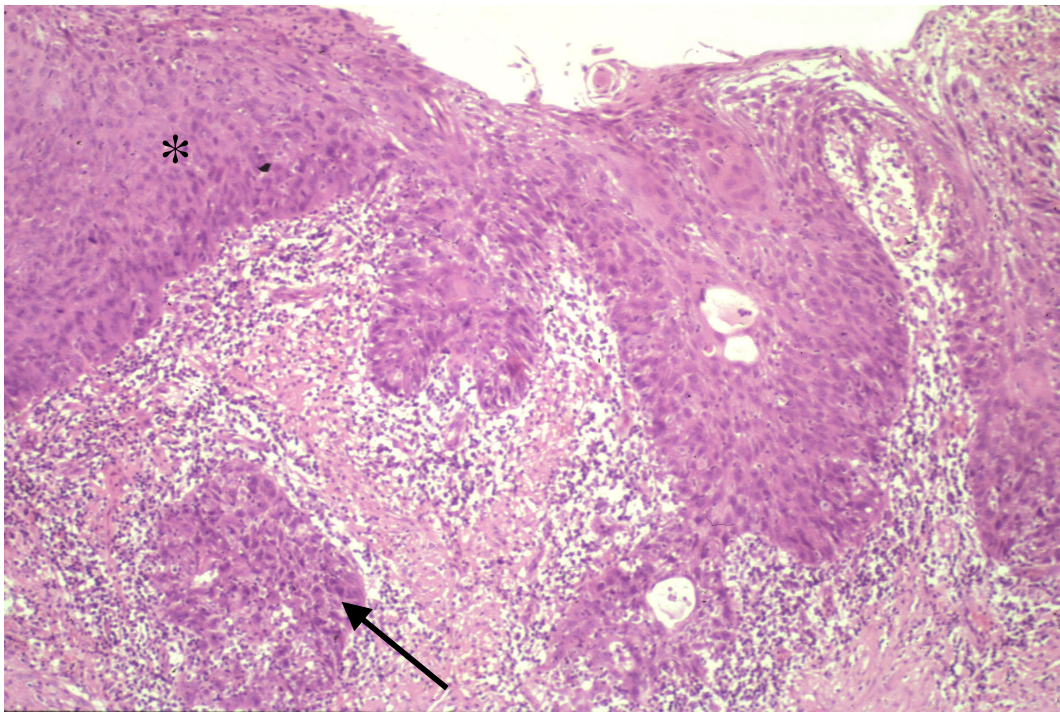


Abb. 22: Mikroinvasives Plattenepithelkarzinom der rechten Stimmlippe. Das Plattenepithel zeigt Zellunregelmäßigkeiten in allen Zellschichten (*). Unterhalb der Basalmembran stellt sich das Tumorzellinfiltrat dar (→); HE-Färbung, x 100

Die Ergebnisse der Korrelation von Fluoreszenz und histologischer Diagnose sind in der Tabelle 4 dargestellt.

	F++	F+	F-	Summe
Karzinom	87	39	10	136
Carcinoma in situ	3	2	2	7
Mittlere, leichte Dysplasie	4	12	8	24
Normale Schleimhaut	13	24	109	146
Summe	107	77	129	313

Tab. 4: Korrelation zwischen der abschließenden histologischen Diagnose und der Intensität der Fluoreszenz nach ALA-Applikation der untersuchten Schleimhautbiopsien von Mundhöhle, Oropharynx, Larynx und Hypopharynx (F++: stark positive Fluoreszenz, F+: schwach positive Fluoreszenz, F- nicht nachweisbare Fluoreszenz)

Von den 107 Gewebeproben mit einer starken Rotfluoreszenz (F++) wurden 90 als Karzinom oder Carcinoma in situ diagnostiziert. 53 Proben, die von normaler bzw. dysplastischer Schleimhaut entnommen worden waren, zeigten eine starke oder schwache Fluoreszenz und wurden daher als falsch-positiv gewertet. Die histologische Beurteilung der von fluoreszenz-negativen Schleimhautarealen entnommenen Proben ergab in 117 Fällen ein nicht-malignes Ergebnis, in 12 Fällen allerdings war ein Karzinom nachweisbar. Entsprechend den dargestellten Ergebnissen errechnet sich eine Spezifität von 68,82 % und eine Sensitivität von 91,61 %. Der positive Vorhersagewert beträgt 0,712 und der negative Vorhersagewert 0,907. Nimmt man die gutartigen Papillome (insgesamt 12 Fälle) aus der Gesamtbetrachtung heraus, so ergibt sich für die Spezifität ein Wert von 74,05 %, der positive Vorhersagewert beträgt dann 0,762.

Die Aufgliederung in die einzelnen Organe ist nachfolgend dargestellt (Tabellen 5-8).

Mundhöhle	F++	F+	F-	Summe
Karzinom	8	10	2	20
Carcinoma in situ	-	-	1	1
Mittlere, leichte Dysplasie	-	4	2	6
Normale Schleimhaut	1	3	18	22
Summe	9	17	23	49

Tab. 5: Korrelation zwischen der abschließenden histologischen Diagnose und der Intensität der Fluoreszenz nach ALA-Applikation der untersuchten Schleimhautbiopsien der Mundhöhle (F++: stark positive Fluoreszenz, F+: schwach positive Fluoreszenz, F- nicht nachweisbare Fluoreszenz)

Spezifität: 71,43 %

Sensitivität: 85,71 %

Positiver Vorhersagewert: 0,692

Negativer Vorhersagewert: 0,870

Oropharynx	F++	F+	F-	Summe
Karzinom	22	13	4	39
Carcinoma in situ	-	1	1	2
Mittlere, leichte Dysplasie	2	2	3	7
Normale Schleimhaut	1	7	31	39
Gesamtsaumme	25	23	39	87

Tab. 6: Korrelation zwischen der abschließenden histologischen Diagnose und der Intensität der Fluoreszenz nach ALA-Applikation der untersuchten Schleimhautbiopsien des Oropharynx (F++: stark positive Fluoreszenz, F+: schwach positive Fluoreszenz, F- nicht nachweisbare Fluoreszenz)

Spezifität: 73,91 %

Sensitivität: 87,80 %

Positiver Vorhersagewert: 0,75

Negativer Vorhersagewert: 0,872

Larynx	F++	F+	F-	Summe
Karzinom	53	8	1	62
Carcinoma in situ	3	1	-	4
Mittlere, leichte Dysplasie	2	3	2	7
Normale Schleimhaut	11	12	40	63
Summe	69	24	43	136

Tab. 7: Korrelation zwischen der abschließenden histologischen Diagnose und der Intensität der Fluoreszenz nach ALA-Applikation der untersuchten Schleimhautbiopsien des Larynx (F++: stark positive Fluoreszenz, F+: schwach positive Fluoreszenz, F- nicht nachweisbare Fluoreszenz)

Spezifität: 60 %

Sensitivität: 98 %

Positiver Vorhersagewert: 0,699

Negativer Vorhersagewert: 0,977

In 10 Fällen handelte es sich um Papillome (histologisch eingeordnet unter „normale Schleimhaut“), die aufgrund ihres Proliferationsverhaltens eine sehr kräftige, gut reproduzierbare Rotfluoreszenz zeigen. Nimmt man diese benignen, aber dennoch fluoreszierenden Tumore aus der Berechnung heraus, so ergibt sich eine Spezifität von 70 % und ein positiver Vorhersagewert von 0,783.

Hypopharynx	F++	F+	F-	Summe
Karzinom	4	8	3	15
Carcinoma in situ	-	-	-	-
Mittlere, leichte Dysplasie	-	3	1	4
Normale Schleimhaut	-	2	20	22
Summe	4	13	24	41

Tab. 8: Korrelation zwischen der abschließenden histologischen Diagnose und der Intensität der Fluoreszenz nach ALA-Applikation der untersuchten Schleimhautbiopsien des Hypopharynx (F++: stark positive Fluoreszenz, F+: schwach positive Fluoreszenz, F- nicht nachweisbare Fluoreszenz)

Spezifität: 80,77 %

Sensitivität: 80,0%

Positiver Vorhersagewert: 0,706

Negativer Vorhersagewert: 0,875

4.3 Autofluoreszenz und ALA-Fluoreszenz

Bei allen 11 Patienten, die sowohl mit der AF und ALAF untersucht worden sind, kamen die in der WLE sichtbaren Schleimhautveränderungen auch bei der AF-Endoskopie (AFE) zur Darstellung. Insgesamt zeigte sich in der AF ein besserer Kontrast und damit eine bessere Abgrenzbarkeit. Vergleicht man die AF mit der ALAF so erscheint mit der letzteren eine deutlichere Kontrastierung gegeben zu sein. Die AFE ist jedoch leichter zu handhaben und kann ohne Vorbereitungen im selben Untersuchungsvorgang zugeschaltet werden (Abb. 23-25).

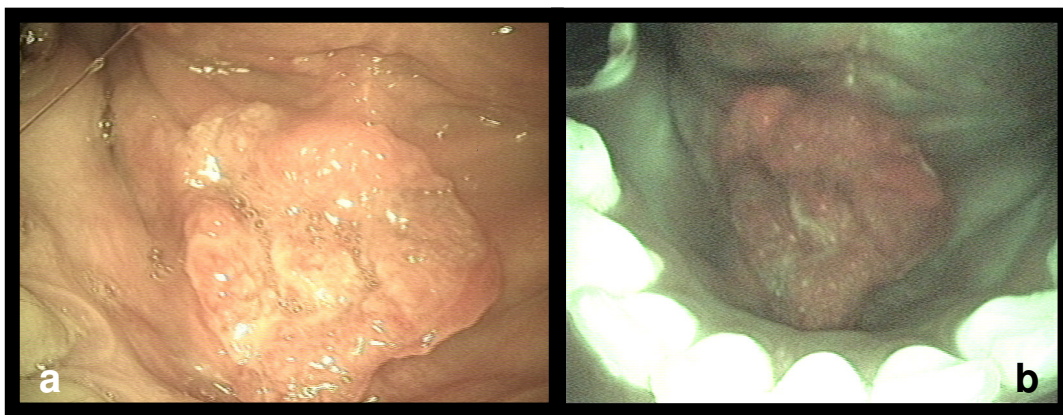


Abb. 23: Plattenepithelkarzinom des vorderen Mundbodens in der WLE (a) und AFE (b). Der Tumor ist gut abgegrenzt und zeigt keine Infiltrationszeichen zum Alveolarkamm hin

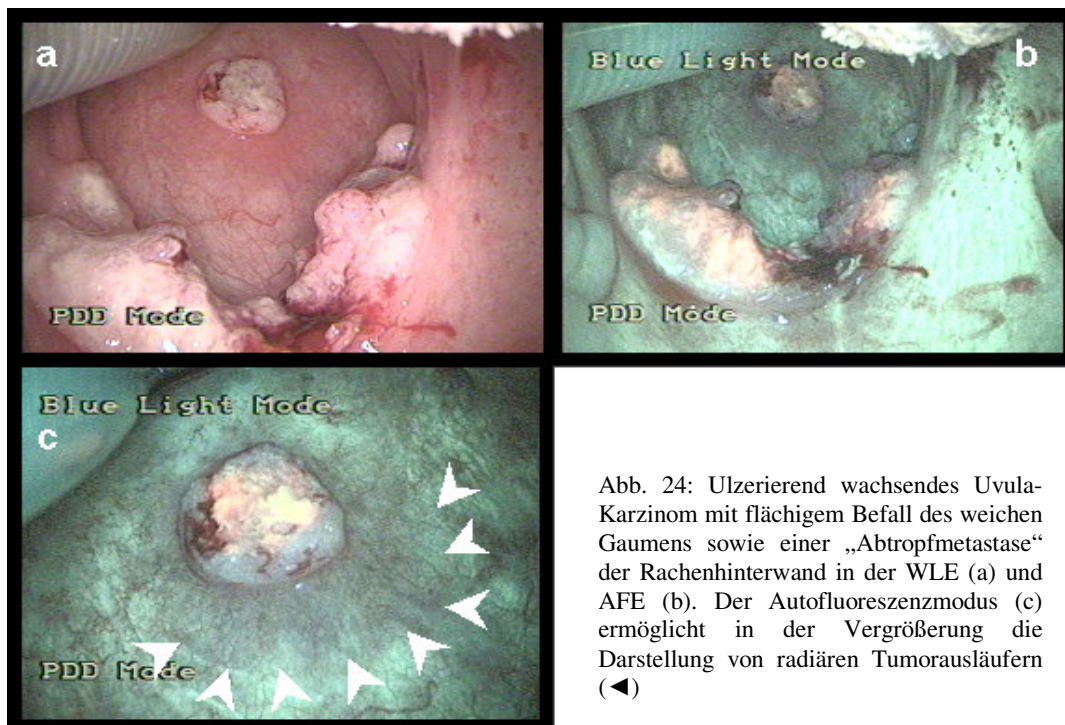


Abb. 24: Ulzerierend wachsendes Uvulakarzinom mit flächigem Befall des weichen Gaumens sowie einer „Abtropfmetastase“ der Rachenhinterwand in der WLE (a) und AFE (b). Der Autofluoreszenzmodus (c) ermöglicht in der Vergrößerung die Darstellung von radiären Tumorausläufern (◄)

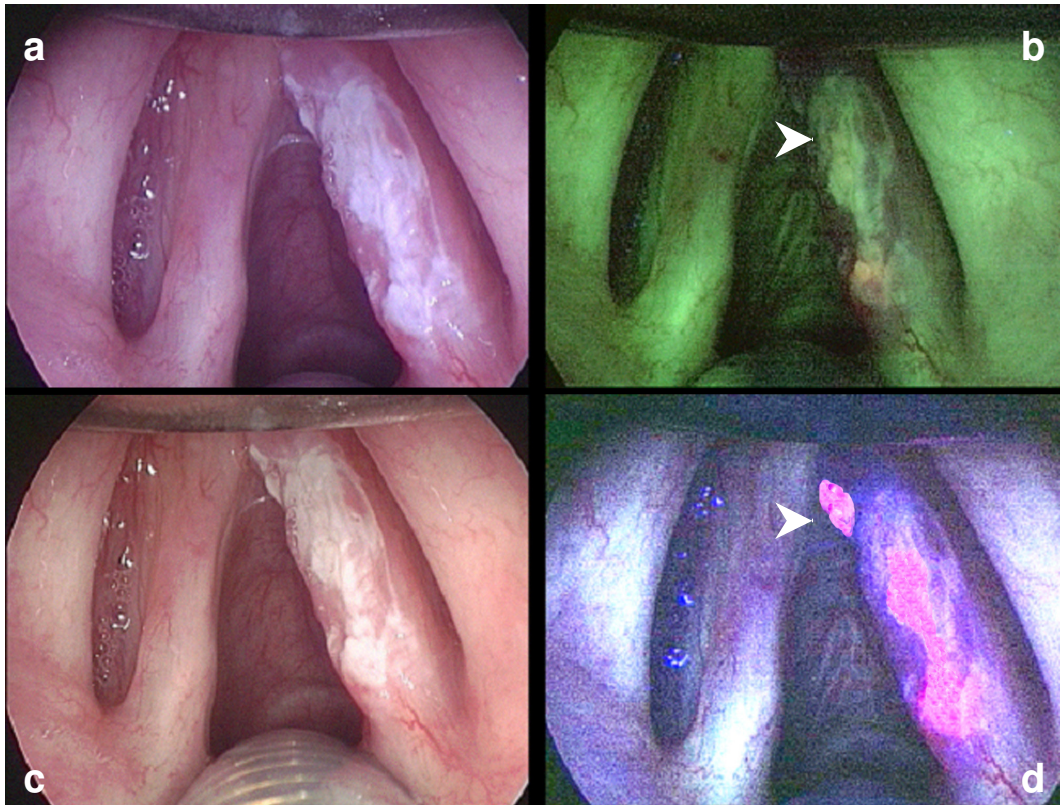


Abb. 25: Endoskopische Befunde bei einer Leukoplakie der rechten Stimmlippe mit fokalem Übergang in ein hochdifferenziertes Karzinom in der WLE (a, c), AFE (b) und ALAFE (d) im Vergleich. In der AF zeigt die pathologisch veränderte Stimmlippenschleimhaut eine klare Fluoreszenzauslöschung. In der ALAFE stellen sich die karzinomatösen Areale am deutlichsten dar. Insbesondere im vorderen Stimmlippendrittel wird die bessere Kontrastierung erkennbar

4.4 Störfaktoren

Bei der Durchführung der AFE und ALAFE traten verschiedene Störfaktoren auf, die eine zuverlässige Beurteilung und vor allem Reproduzierbarkeit nicht immer ermöglichten. So zeigten sich unabhängig von der Tumorlokalisierung und der ALA-Applikation makroskopisch deutlich erkennbare Unterschiede im Fluoreszenzkontrast. Große Tumorflächen führten regelmäßig zu einer geringeren Fluoreszenzintensität. Bei größeren Oro- und Hypopharynxkarzinomen war während der Untersuchung sehr schnell ein Ausbleichen der Fluoreszenz (Fotobleaching) festzustellen. Als sehr störend erwiesen sich unspezifische Fluoreszenzanreicherungen durch Bakterien- und Pilzbesiedelungen. Kleinere Blutungen, die bei ulzierenden Tumoren der Schleimhaut schon bei minimalen Berührungen durch das Endoskopieinstrumentarium auftreten

können, führten zu einer nahezu vollständigen Auslöschung der Fluoreszenz (Abb. 26-30).

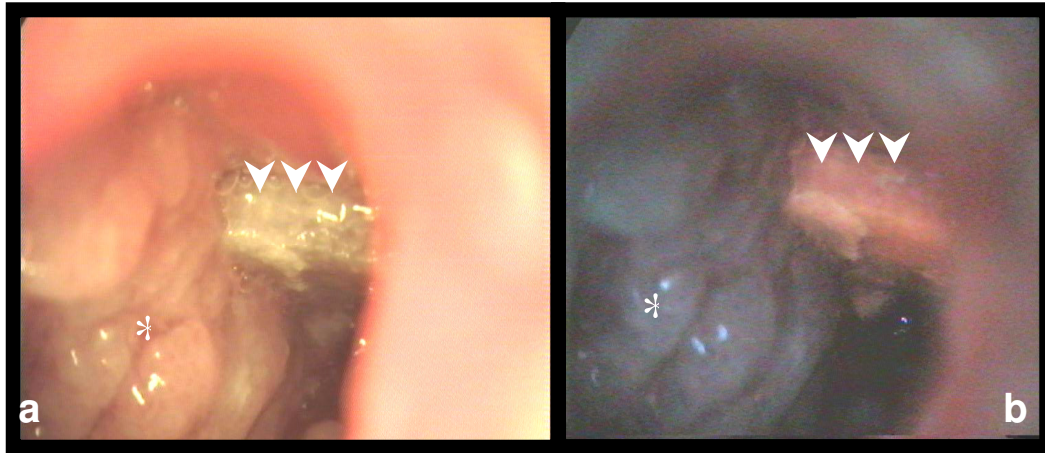


Abb. 26: Hypopharynxkarzinom rechts (a). In der ALAFI (b) zeigt der freiliegende, mit Bakterien kontaminierte Schilddrüsenknötchen (◄) eine Rotfluoreszenz, während die Karzinomanteile (*) weitgehend kontrastarm bleiben

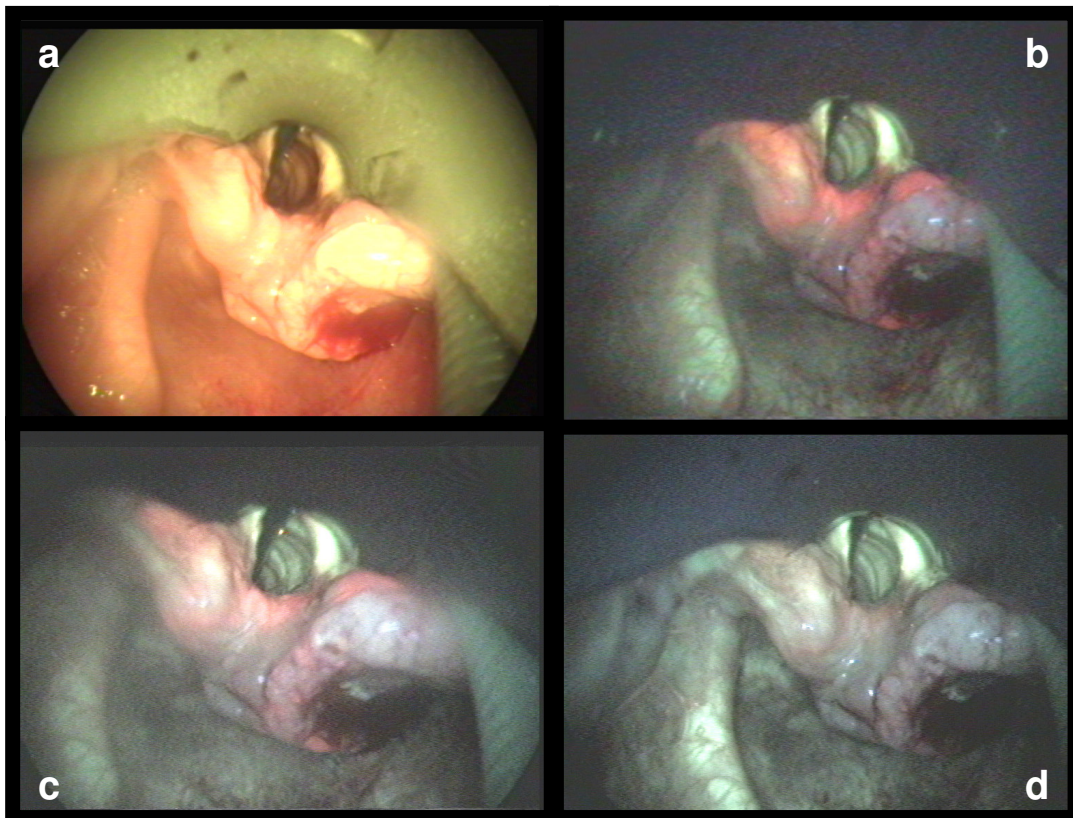


Abb. 27: Hypopharynxkarzinom rechts in der WLE (a) und ALAFI (b-d). Im zeitlichen Verlauf kommt es zu einem Ausbleichen (Photobleaching) der ALA-induzierten Rotfluoreszenz. Nach 90 Sekunden (c) und 180 Sekunden (d) ist eine deutliche Abnahme der Rotfluoreszenz festzustellen

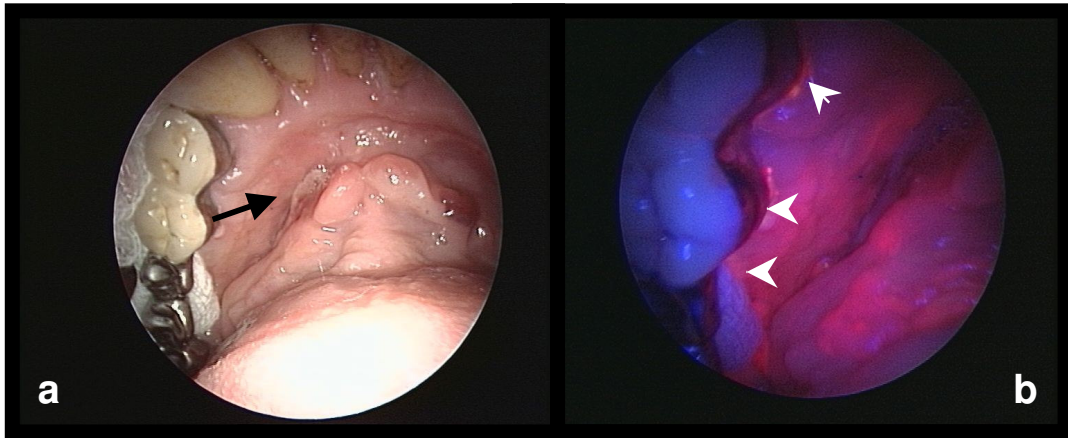


Abb. 28: Kleines Karzinom (→) des vorderen Mundbodens links in der WL (a). Die kräftige Rotfluoreszenz in der ALAFI (b) entspricht der parodontalen Bakterienbesiedelung, das Karzinom ist nicht eindeutig abgrenzbar

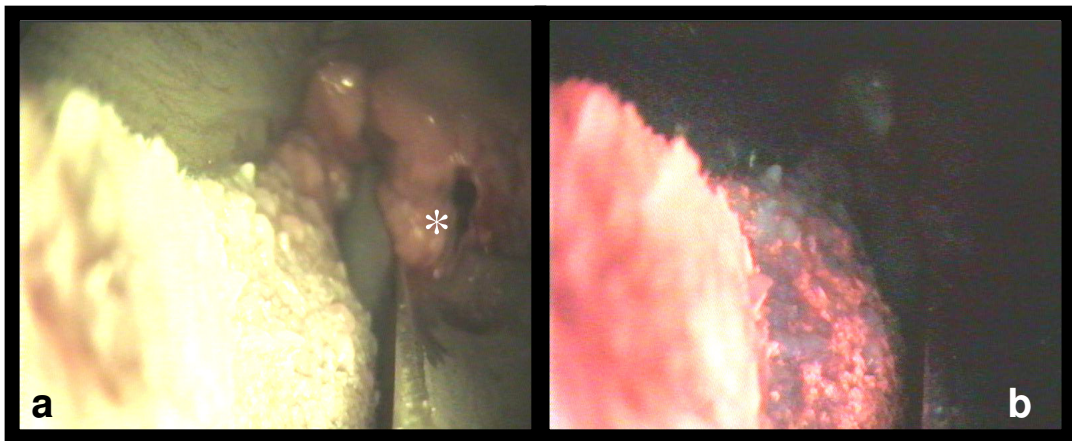


Abb. 29: Unspezifische Rotfluoreszenz der Zungenoberfläche (b). In der WLE (a) stellt sich das Karzinom der Uvula (*) nicht dar

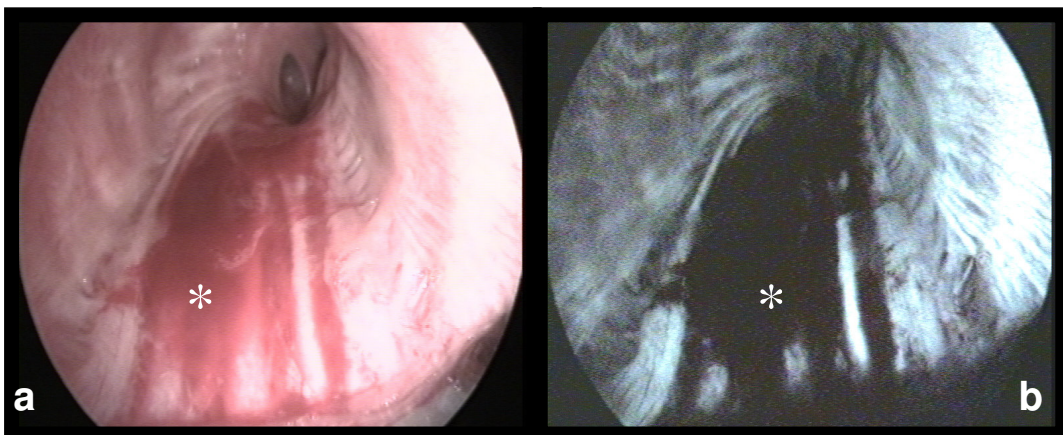


Abb. 30: Rechter Hauptbronchus in der WLE (a) und AFE (b). Bereits geringe Blutauflagerungen (*) führen zu einer kompletten Fluoreszenzauslöschung und lassen keine weitere Beurteilung zu

Bei der ALA-Applikation für die Fluoreszenzendoskopie wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Die Inhalation von ALA wurde von allen Patienten gut toleriert. Viele Patienten mußten während der ersten Inhalationszüge husten oder empfanden den sauren Geschmack der Substanz teilweise als unangenehm. Kein Patient mußte jedoch aus diesen Gründen die Inhalation abbrechen. Bei der Mundspülung wurde ebenfalls von einigen Patienten über den sauren Geschmack berichtet. Es trat in keinem Fall eine systemische Fotosensibilisierung mit nachfolgender Rötung oder Ödembildung der Schleimhaut und/oder der Haut auf.

Nach topischer Applikation von ALA-Creme zur Diagnostik von Hautveränderungen des Gesichtes klagten 3 von 8 Patienten während der Untersuchung über z.T. starke brennende Schmerzen im Bereich der vorbehandelten Haut. Aufgrund sehr starker Schmerzen im Bereich der untersuchten Nasenspitze wurde bei einer Patientin die Fluoreszenzuntersuchung abgebrochen.

5 Diskussion:

Die Prognose von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der oberen Luft- und Speisewege wird entscheidend beeinflusst von der frühzeitigen Diagnosestellung der malignen Erkrankung. Ungeachtet der guten endoskopischen und mikroskopischen Zugänglichkeit von Gesichtshaut und Schleimhäuten der oberen Luft- und Speisewege können Präkanzerosen, schwere Dysplasien (Carcinoma in situ) und Frühkarzinome, insbesondere nach bereits erfolgter Chirurgie und/oder Strahlentherapie, nicht frühzeitig und sicher diagnostiziert werden.

Vor diesem Hintergrund werden seit einigen Jahrzehnten verschiedenste Ansätze zur Verbesserung der Diagnostik von Kopf-Hals-Malignomen verfolgt. Erste Experimente zur Anfärbung maligner Mundschleimhaut mit Lugol'scher Lösung wurden von Morgenroth beschrieben, der eine ursprünglich von Schiller zur Früherkennung des Zervixkarzinoms entwickelte Technik anwandte [Morgenroth, 1957; Schiller, 1928]. Die damit erzielten Ergebnisse waren jedoch nicht verlässlich. 1963 wurde erstmals von Richart der Farbstoff Toluidinblau zur Darstellung der Tumorgrenzen beim Zervixkarzinom benutzt [Richart, 1963]. Toluidinblau ist ein Farbstoff, der intrazelluläre DNA und RNA bindet und somit anfärbt. Die verstärkte Anfärbung von malignem Gewebe mittels Toluidinblau beruht auf dem höheren Gehalt von Nukleinsäuren in malignem Gewebe sowie in einer verstärkten Gewebepenetration. In den folgenden Jahren wurde Toluidinblau auch auf dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde vermehrt eingesetzt [Epstein et al., 1992; Niebel et Chomet, 1964; Sabes et al., 1972; Shedd et al., 1965; Strong et al., 1968]. Trotz anfänglicher Erfolge konnte sich das Verfahren aufgrund der hohen Rate an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen nicht etablieren [Epstein et al., 1992; Sabes et al., 1972].

Seit den frühen 40er Jahren begannen verschiedene Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von intrazellulär gelegenen Fluoreszenzmarkern. So beschrieben Dunn und Devine eine fluoreszenzoptische Markierung von Kopf-Hals-Tumoren bei 54 Patienten mit Tetrazyklinen [Dunn et Devine, 1972]. Die hierdurch erzielten Ergebnisse standen jedoch in keinem Verhältnis mit dem apparativen und zeitlichen Aufwand, weshalb sich diese Methode nicht durchsetzen konnte [Nessel et Wiggemann, 1965]. 1948 berichteten Figge und Mitarbeiter erstmals über die Detektierung eines malignen

Tumors durch Porphyrin-induzierte Rotfluoreszenz [Figge et al., 1948]. Es folgten weitere erfolgreiche Anwendungen mit Hämatoporphyrinderivaten [Lipson et al., 1961; Rassmussen-Taxdal et al., 1955].

Auf dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde setzten 1971 Leonard und Beck systemisch applizierte Hämatoporphyrinderivate erstmals zur Diagnostik von Tumoren in der Mundhöhle, Pharynx, Larynx und Hypopharynx ein [Leonhard et Beck, 1971]. Die Autoren konnten in allen 29 untersuchten Patienten das Malignom mittels Fluoreszenzmarkierung nachweisen. Der wesentliche Nachteil dieser Methode besteht in einer für Wochen bis Monate anhaltenden Photosensibilisierung der gesamten Haut, die es erforderlich macht, dass die Patienten sich entsprechend lange vor Sonnenlichtexposition schützen müssen. Werden diese Vorsichtsmaßnahmen nicht beachtet, so können heftige Sonnenbrände mit oberflächlichen Hautnekrosen und Ödemen auftreten [Feyh et al., 1993]. Als weiterer Nachteil ist die relativ niedrige Tumorselektivität der synthetischen Porphyrine zu nennen [Abels et al., 2000].

Keines der genannten Verfahren konnte sich bis heute für einen Einsatz in der klinischen Routine behaupten, da einerseits die Sensitivität zu gering und andererseits der personelle und apparative Aufwand viel zu hoch ist [Abels et al., 2000; Ghadially et Neish, 1960; Gossweiner et al., 1987; Harris and Werkhavern, 1987; Leonhard et Beck, 1971; Niebel et Chomet; 1964; Portugal et al., 1996; Pottier, 1990; Pottier et al., 1986; Rubino et Rasetti, 1966; Sabes et al., 1972].

Seit Beginn der neunziger Jahre ist die Fluoreszenzdiagnostik in nahezu allen medizinischen Fachgebieten erneut Gegenstand experimenteller und klinischer Untersuchungen. Es besteht dabei einerseits das Ziel, durch die Entwicklung von leistungsfähigeren, aber gleichermaßen auch kleineren, weniger aufwendigen Geräten die technischen Voraussetzungen für den Einsatz in der klinischen Routine zu schaffen. Andererseits soll durch den Einsatz neuer, möglichst nebenwirkungsarmer Photosensibilisatoren die Fluoreszenzendoskopie zu einem effektiven Diagnostikverfahren entwickelt werden [Baumgartner et al., 1992 et 1996; Fritsch et al., 1997; Gamarra et al., 2000; Gossner et Ell, 1995; Gossner et al., 1999; Hillemanns et al., 1999; Kriegmair et al., 1994 et 1996; Messmann et al., 1999; Regula et al., 1995; Schmidt, 1996; Schmidt et al., 1996; Stummer et al., 1998; Szeimes et al 2000].

Eine klinisch sehr erfolgversprechende Substanz für die Fluoreszenzdiagnostik stellt die 5-Aminolävulinsäure (ALA) dar. ALA ist ein Metabolit der Hämbiosynthese und wird von malignen Zellen schneller und verstärkt aufgenommen [Langer et al., 1999]. Durch Umbauprozesse wird schließlich rotfluoreszierendes Protoporphyrin IX (PpIX) gebildet. ALA ist sowohl systemisch als auch lokal applizierbar.

Kriegmair et al. führten die ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie in die Klinik ein [Kriegmair et al., 1996]. Mit Hilfe dieser neuen Substanz konnten die Autoren im Rahmen der zystoskopischen Diagnostik des Harnblasenkarzinoms eine Steigerung der Sensitivität von 73 auf 93% erreichen [Kriegmair et al., 1999a]. Über ähnlich gute Ergebnisse nach lokaler Applikation von ALA wurden in klinischen Studien in der Gastroenterologie [Messmann et al., 1999], der Pulmologie [Baumgartner et al., 1992 et 1996] und Dermatologie [Fritsch et al., 1997] berichtet. In Anlehnung an diese vielversprechenden Ergebnisse wurde 1990 von Kennedy et al. ALA zur Diagnostik und photodynamischen Therapie von Basalzellkarzinomen der Gesichtshaut eingesetzt [Kennedy et al., 1990]. Es folgten weitere diagnostische Anwendungen an der Schleimhaut der oberen Luft- und Speisewege [Betz et al., 1997; Leunig et al., 1996a; Leunig et al., 1996b; Mehlmann et al., 1999].

Zeitgleich erhielt die Autofluoreszenz-Diagnostik einen neuen Stellenwert. Tumorös verändertes Gewebe zeigt eine abgeschwächte Autofluoreszenz und lässt sich so von Normalgewebe abgrenzen. Es wird bei dieser Technik kein Photosensibilisator benötigt [Lam et al., 1990]. Lam et al. aus Vancouver konnten für das Bronchialkarzinoms mit dem sog. LIFE-System (lung imaging fluorescence endoscope) erste, sehr ermutigende Ergebnisse mit der Autofluoreszenz-gestützten Bronchoskopie erzielen [Lam et al., 1993]. Es folgten rasch erste Anwendungen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege, wobei als Endoskopiesystem überwiegend das sog. D-LIGHT-System eingesetzt wurde [Arens et al., 1999; Betz et al., 1999 et 2000; Dhingra et al., 1998; Fryen et al., 1997; Gillenwater et al., 1998a; Harries et al., 1995; Kulapaditharom et al., 1998; Boonkittcharoen 1998; Kolli et al., 1995; Külkens et al., 2000; Žargi et al., 1997 et 2000].

5.1 Grundlagen der Fluoreszenzdiagnostik

5.1.1 *Autofluoreszenz*

Die vom Gewebe selbst, also unabhängig von einer Verabreichung eines Photosensibilisators, anregbare Fluoreszenz wird als Autofluoreszenz bezeichnet. Das Phänomen der Autofluoreszenz wurde bereits in der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts beschrieben. 1924 konnte Policard erstmals endogene Porphyrine in humanen Tumoren nachweisen [Policard, 1924]. 30 Jahre später wurde von Ronchese beobachtet, dass für die Entstehung der roten Fluoreszenz die ulzeröse Oberfläche der Plattenepithelkarzinome verantwortlich ist [Ronchese, 1954]. Schließlich konnte Ghadially 1960 nachweisen, dass diese Fluoreszenz teilweise durch eine endogene Porphyrin-Produktion von im Tumorkulus wachsenden Bakterien mit verursacht wird [Ghadially, 1960; Ghadially et Neish, 1960].

Die Erscheinung und das Ausmaß der Autofluoreszenz wird ganz wesentlich von der Gewebebeschaffenheit bestimmt, insbesondere vom Gehalt an fluoreszierenden Bestandteilen, den sog. Fluorophoren. Unabhängig von den Porphyrinen sind andere im Gewebe vorhandene Zellkomponenten für die Autofluoreszenz verantwortlich. Eine große Rolle spielen Molekülgruppen, die sog. Chromophoren, die hauptsächlich in den zellulären Makromolekülen der Submukosa lokalisiert sind. Eine Reihe der im Gewebe vorkommenden Fluorophoren konnte inzwischen identifiziert werden. Neben den Porphyrinen lassen sich biochemische Strukturen wie z.B. das Tryptophan und andere Aminosäuren mit aromatischen Ringsystemen durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz anregen [Harris et Werkhaven, 1987]. NADH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid), ein Coenzym für die Dehydrierung primärer und sekundärer Alkohole und Flavine, besitzt das Anregungsmaxima im nahen UV bzw. im blauen Spektralbereich [Richards-Kortum et Sevic-Muraca, 1996]. Insbesondere die Flavine tragen mit ihrer breiten Emissionsbande zur Untergrundfluoreszenz bei. Der größte Anteil der Autofluoreszenz entsteht im Bindegewebe durch Kollagen und elastische Fasern [Fryen et al., 1997].

Das Spektrum der Gewebe-Autofluoreszenz muss immer als Summe der Gewebekomponenten aufgefasst werden und hängt damit neben den Gewebsstrukturen und deren Stoffwechselaktivität auch ganz wesentlich von morphologischen Aspekten ab [Fryen et al., 1997; Malzahn et al., 2002,]. Strukturelle Faktoren, insbesondere die

Verdickung des Bindegewebe bedeckenden Epithels, führen in dysplastischen oder malignen Arealen zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Hierfür sind zwei Mechanismen zu nennen. Zum einen wird das Anregungslicht beim Eintritt in das subepitheliale Bindegewebe durch das tumorös verdickte Epithel, welches selbst nicht fluoresziert, abgeschwächt, bevor es zur eigentlichen Anregung der Bindegewebsfluoreszenz kommt. Weiterhin wird das in der Bindegewebsschicht schließlich erzeugte Fluoreszenzlicht beim Austritt aus dem Bindegewebe durch das entsprechend verdickte Epithel gedämpft und damit erneut abgeschwächt. Entsprechend fluoresziert deepithelisierte Schleimhaut besonders stark, während Neubildungen im weitesten Sinne zur einer Abschwächung der Autofluoreszenz führen [Alfano et al., 1984].

An einem Hamster-Tiermodell wurden die fluoreszenzendoskopischen Bilder hinsichtlich der Fluoreszenzintensität gewertet, so dass eine Unterscheidung anhand des Fluoreszenzbildes zwischen maligne und benigne getroffen werden konnte. Die Autoren berichteten bei 32 untersuchten Schleimhautarealen über eine Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 80% [Kluftinger et al., 1992]. Mit dem für die Untersuchung des Bronchialsystems konzipierten LIFE-System konnten Harries et al. im Larynx maligne und benigne Schleimhaut anhand des Fluoreszenzbildes voneinander unterscheiden [Harries et al., 1995]. In folgenden Jahren wurde in weiteren klinischen Untersuchungen die Autofluoreszenzendoskopie an der Schleimhaut der oberen Luft- und Speisewege eingesetzt, wenngleich die Ergebnisse und der Stellenwert dieser Technik zum Teil kontrovers diskutiert werden (siehe auch Kapitel 5.2.4.).

5.1.2 ALA-induzierte Fluoreszenz

Die 5-Aminolävulinsäure (ALA) ist das Ausgangsprodukt der intrazellulären Hämbiosynthese, zu der alle kernhaltigen Zellen befähigt sind. Bei ausreichender Konzentration an freiem Häm wird die weitere Synthese von ALA durch eine Rückkopplung inhibiert. Dieser Feed-back-Mechanismus greift nur bei der Synthese des ersten Zwischenprodukts, der 5-Aminolävulinsäure, ein. Unter diesen Bedingungen akkumulieren keine intermediären Porphyrinogene, die im weiteren Syntheseweg zu fluoreszierenden Porphyrinen umgebaut werden könnten. Die Substanz ALA zeigt selbst keine Fluoreszenz.

Nach exogener ALA-Applikation kommt es intrazellulär zu einer Anreicherung endogener Porphyrine, insbesondere von Protoporphyrin IX (PpIX). PpIX ist das entscheidende Fluorochrom, das während der fluoreszenzdiagnostischen Untersuchung nachgewiesen wird. Es handelt sich hierbei um einen rotfluoreszierenden Farbstoff, der sich in maligne transformierten Zellen verstärkt akkumuliert [Kennedy et al. 1990]. Das lipophile und monomere PpIX hat zusätzlich zu seiner Fluoreszenz auch phototoxische Eigenschaften [Inuma et al., 1995].

Die Mechanismen, die nach Gabe von ALA zu einer erhöhten Anreicherung von fluoreszierendem PpIX im malignen Gewebe führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt und werden in der Literatur vielfach kontrovers diskutiert [Hiraki et al., 1996; Inuma et al., 1995; Kennedy et al., 1990; Kessel et Smith, 1989; Kocher et al., 1981; Pantelides et al., 1989; Tachikawa et al., 1984]. So sind vom Zeitpunkt der Verabreichung mit ALA bis zur Bildung des fluoreszierenden PpIX im Tumor viele Teilschritte notwendig, die zu einer Tumorselektivität beitragen können.

Ein Grund für die Mehranreicherung von PpIX in den Tumorzellen nach exogener ALA-Applikation scheint die verringerte Anzahl von Interzellularverbindungen im Tumor mit daraus resultierender Lockerung des Zellverbandes zu sein. Durch Veränderungen an der Zellmembran der Karzinomzellen kommt es insgesamt zu einer Abnahme der natürlichen Diffusionsbarriere [Hiraki et al., 1996; Kennedy et al., 1990; Kocher et al., 1981; Tachikawa et al., 1984]. Andererseits wird ALA auch aktiv in die Zelle aufgenommen, weshalb die in malignen Zellen erhöhte Anzahl und verstärkte Aktivität der Kanalproteine in der Zellmembran zusätzlich zu einer Akkumulation beitragen kann [Inuma et al., 1995]. Auch konnten in den Tumorzellen vermehrt LDL-Bindungsplätze nachgewiesen werden [Kessel et Smith, 1989, Pantelides et al., 1989].

Die vermutlich wichtigste Ursache für die verstärkte („selektive“) Anreicherung von PpIX ist die veränderte katalytische Aktivität der Häm-produzierenden Enzyme in der Tumorzelle. Insbesondere spielt die in malignen Zellen nachgewiesene verminderte Aktivität des Enzyms Ferrochelatase eine Schlüsselrolle [Navone et al., 1990; Rasetti et al., 1967; Rubino et Rasetti 1966; van Hillegersberg et al., 1992]. Das Enzym Ferrochelatase katalysiert unter physiologischen Bedingungen den Einbau von Eisen in

PpIX unter Bildung von Häm. Die erniedrigte Ferrochelataseaktivität sowie die gleichzeitig gesteigerte Aktivität der Enzyme 5-Aminolävulinsäure-Dehydrogenase und Porphobilinogen-Desaminase führen zu einer überproportionalen Anreicherung von PpIX in den Tumorzellen.

In einer Vielzahl unterschiedlicher maligner Tumoren konnte eine Abnahme der Ferrochelataseaktivität um den Faktor 2-10 gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden [Batlle, 1993; Dailey et Smith 1984; El-Sharabasy et al., 1992; Kondo et al., 1993; Rasetti et al., 1967; Schoenfeld et al., 1988; Smith, 1987; van Hillegersberg et al., 1992, 1994 et 1995]. Dieser Zustand führt bereits natürlicherweise, das heißt auch ohne exogene Zufuhr von ALA, zu einer Anreicherung von Porphyrinen in den Tumorzellen bei gleichzeitig geringerer intrazellulärer Konzentration von Häm [Schoenfeld et al., 1988].

Die ALA-induzierte Fluoreszenz wird ganz wesentlich von der Dosis und der Applikationsart des Photosensibilisators beeinflusst. Ausschlaggebend ist, dass durch die Sensibilisierung ein ausreichendes Kontrastverhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe gebildet werden kann [Bermudez-Moretti et al., 1993]. Im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Hämatoporphyrinderivaten, die zu einer über Wochen anhaltenden generalisierten Photosensibilisierung führen, führt ALA in den klinisch applizierten Konzentrationen nur zu einer kurz anhaltenden Lichtempfindlichkeit von 8-24 Stunden [Svanberg et al., 1993]. Lippert et al. [2002] konnten durch Messung der Abbauprodukte von ALA in Blut, Stuhl und Urin zeigen, dass nach topischer Applikation von ALA bereits 24 Stunden später wieder Normalwerte in den Ausscheidungsprodukten vorliegen und somit keine Gefahr einer prolongierten Photosensibilisierung besteht. Aufgrund dieser schnellen Abklingkinetik und einer stärkeren Tumorselektivität von ALA wird dieser Marker als derzeit bester Photosensibilisator favorisiert [Tralau et al., 1990].

Für die fluoreszenzgestützte Diagnostik sollte ALA niedrig dosiert verabreicht werden, da es sonst neben einer Absättigung des Tumorgewebes auch zu einer überhöhten Bioverfügbarkeit in der umgebenden normalen Schleimhaut kommt. Die Folge ist das Überschreiten eines Schwellenwertes im gesunden Gewebe mit einer Abnahme des Fluoreszenzkontrastes [Loh et al., 1993]. Klinisch zeigt sich ein stark fluoreszierendes

Tumoreal umgeben von einer ebenfalls fluoreszierenden gesunden Schleimhaut, so dass eine Abgrenzung erschwert ist.

Andererseits ist bei zu geringer Konzentrationen von ALA die Verfügbarkeit im Gewebe für die dort vorliegende enzymatische Aktivität zu niedrig. Die Folge ist eine zu niedrige Synthese und damit verminderte Anreicherung von PpIX. In Abhängigkeit von der ALA-Konzentration vermögen verschiedene Tumordifferenzierungsgrade in unterschiedlichem Maße PpIX anzureichern und damit auch Unterschiede in der Fluoreszenzintensität hervorzurufen [Wyss-Desserich et al., 1996]. Wahrscheinlich variiert der Schwellenwert zur Abgrenzung von Tumor- und umliegendem Normalgewebe von Gewebe zu Gewebe. Die hier verwendeten ALA-Konzentrationen erwiesen sich für die topische Applikation im Bereich der oberen Luft- und Speisewege als ausreichend, wenngleich weitere Optimierungen auch in Kombination mit der Applikationsart (topisch oder systemisch) vorgenommen werden sollten.

Ein weiterer Vorteil der ALA-induzierten Fluoreszenz im Kopf-Hals-Bereich ist die Variabilität der Applikationsmöglichkeiten. ALA kann sowohl systemisch als auch lokal durch Inhalation oder als Spülung an der Schleimhaut und in Salbenform an der äußeren Haut appliziert werden [Leunig et al., 1996a, 1996b; Szeimies et al., 1996a, 1996b].

Nach lokaler ALA-Gabe (Spülung /Inhalation) kommt es nach entsprechender Inkubationszeit in den obersten Gewebeschichten zu einer Farbstoff-Akkumulation, während die tieferen nicht ausreichend penetriert werden. Die Beschränkung der PpIX-Fluoreszenz auf oberflächliche epitheliale Gewebsschichten beruht neben der stoffwechselbedingten selektiven Anreicherung von PpIX auch auf der begrenzten Eindringtiefe des Anregungslichtes in das Gewebe. Die Wellenlänge von 400-410 nm (Soret-Bande), bei der PpIX am stärksten aktiviert wird, dringt lediglich bis zu 2 mm ins Gewebe ein [van Hillegersberg et al., 1994, Kriegmair et al., 1996]. Mit zunehmender Wellenlänge vergrößert sich zwar die Eindringtiefe in das Gewebe, andererseits nimmt das Absorptionsverhalten ab [Dougherty et Marcus 1992; van Hillegersberg et al., 1994]. So absorbiert PpIX im roten Spektralbereich bei 635 nm (Q-Bande) deutlich schwächer, woraus eine verminderte Fluoreszenzintensität resultiert. Für die Fluoreszenzdiagnostik ist die geringe Eindringtiefe einerseits nachteilig, jedoch

tritt dieser Nachteil bei der Beurteilung kleiner, oberflächlich wachsender, Frühkarzinome - und diese sollten mit dieser Technik ja gerade detektiert werden - in den Hintergrund. Für die photodynamische Therapie allerdings, wo die Gewebeerstörung im Vordergrund steht, ist eine tiefere Gewebepenetration wünschenswert [Grant et al., 1993a; Svaasand et Ellingsen, 1985].

Für den Bereich der oberen Luft- und Speisewege hat sich die topische Applikation sehr bewährt [Leunig et al., 2000a, 2000b; Betz et al., 1997; Lippert et al., 2000, Lippert et Werner, 2002]. Bei Schleimhautveränderungen der Mundhöhle und des Oropharynx wird eine orale Spülung mit ALA-Lösung, zur Beurteilung von Larynx- und Hypopharynx eine ALA-Inhalation durchgeführt. Neben dem zufriedenstellenden klinischen Fluoreszenzkontrast erwiesen sich die lokalen ALA-Applikationen in der klinischen Routineuntersuchung als gut praktikabel. Der große Vorteil besteht in der einfachen Handhabung sowohl für den Patienten als auch für den behandelnden Arzt, bzw. das Pflegepersonal. Aufgrund der lokalen Gabe sind systemische Nebenwirkung praktisch ausgeschlossen und ein aufwendiger Lichtschutz im Operationssaal ist nicht erforderlich.

Bei der Untersuchung von Hautveränderungen zeigte sich nach topischer Salbenverabreichung ebenfalls eine sehr gute Fluoreszenz, so dass hier kein Bedarf für eine systemische Gabe besteht. Die Inkubation kann mit 20 %iger ALA-Creme oder einem 20 %igem ALA-Gel durchgeführt werden. Wichtig ist, dass nach dem Auftragen das Untersuchungsareal mit einer Okklusionsfolie abgedeckt wird [Fritsch et al., 1998a, 1998b; Szeimies et al., 1996a, 1996b]. Das DMSO-haltige Gel führt aufgrund der optimierten Gewebepenetration zu einer höheren Fluoreszenzintensität, während die ALA-Creme nach 1-2 Stunden eine höhere Ratio von Tumor zu Normalgewebe zeigt. Szeimies et al. halten daher die ALA-Creme besser für die photodynamische Diagnostik und das ALA-Gel besser für die photodynamische Therapie geeignet [Szeimies et al., 2000].

Die lokale Applikation von ALA ist jedoch bei der Untersuchung schwer zugänglicher Regionen limitiert. So wird die Schleimhaut in Pharynx und Hypopharynx sowohl durch die Spülung als auch durch die Inhalation oft nicht ausreichend sicher benetzt. Hier ist dann eine systemische ALA-Applikation zu erwägen, wie sie beispielsweise

bereits zur Diagnostik und Therapie von Ösophagusveränderungen [Ell et al., 2000] oder bei Hirntumoren [Stummer et al., 1998] angewendet wird. Die systemische ALA-Gabe erfolgt derzeit mit einer Dosierung von 20-40 mg/kg Körpergewicht. Das in Saft gelöste ALA wird von den Patienten getrunken [Gossner et Ell, 1995]. Zur Vermeidung von Färbeartefakten in der Mundhöhle und des Oropharynx hat sich die Applikation über eine passager eingelegte Ernährungssonde bewährt [Lippert et al., 2000]. Die maximale tolerable ALA-Dosis für die orale Aufnahme liegt bei 60 mg/kg Körpergewicht. Höhere Dosierungen können zu Übelkeit und Erbrechen, sowie zu Leberschädigungen führen [Ell et al., 2000; Kleemann et al., 1996]. Erfahrungen zur intravenösen Applikation am Menschen liegen bisher noch nicht vor.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die zeitliche Abstimmung zwischen ALA-Applikation und Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik. Der optimale Untersuchungszeitpunkt wird ganz wesentlich durch den Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenzintensität im Tumorgewebe bzw. durch den maximalem Unterschied zum umgebenden Normalgewebe bestimmt. Durch fluoreszenzspektroskopische Messungen konnten Leunig und Mitarbeiter den optimalen Untersuchungszeitpunkt sowohl nach ALA-Inhalation als auch nach der ALA-Spülung für Karzinome der Mundhöhle und des Oropharynx ermitteln [Leunig et al., 1996a]. Hierzu wurde das Verhältnis von PpIX-Fluoreszenzintensität zwischen Tumor- und Normalgewebe berechnet („T/N-Ratio“) und im zeitlichen Verlauf nach ALA-Applikation bestimmt. Es zeigte sich im gesamten Zeitverlauf von bis zu drei Stunden eine um den Faktor 10 erhöhte Fluoreszenz über dem Tumor. Die bereits vor der ALA-Applikation erhöhten Fluoreszenzintensitäten im Tumorbereich sind als endogene Fluoreszenz von Bakterienbelägen zu interpretieren, die bei den häufig ulzerierten Tumoren an der Schleimhaut der oberen Luft und Speisewege praktisch immer nachweisbar sind. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten (als Absolutwerte) wurden im Zeitraum von 1 bis 2 Stunden nach der Applikation gemessen. Die optimale Zeitspanne zwischen ALA-Applikation und Fluoreszenzuntersuchung beträgt somit ca. 1,5 Stunden [Leunig et al., 1996a, 2000a]. Im klinischen Alltag kann dieses Zeitintervall jedoch nicht immer eingehalten werden. Die eigenen Erfahrungen zeigen, dass bei zeitlichen Verzögerungen von bis zu 2 Stunden keine wesentlichen Veränderungen der Fluoreszenzintensität aufgetreten sind. Die genaue Einhaltung des Zeitintervall erscheint somit nicht eine absolute Voraussetzung für die ALA-Fluoreszenzendoskopie zu sein.

5.2 Stellenwert der Fluoreszenzendoskopie in der klinische Anwendung vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse

5.2.1 Tumoren der Gesichtshaut

Die Diagnose von Präkanzerosen oder Tumoren der Haut in vorbehandelten oder vernarbten Arealen ist oft sehr schwierig. Insbesondere hängt die Wahl der Entnahmestelle von Gewebeproben zur histologischen Diagnosesicherung bzw. die Festlegung der Resektionsgrenzen von der Erfahrung des behandelnden Arztes ab. Ein mögliches Hilfsmittel in der Diagnostik und letztlich auch zur Erlangung einer größeren Behandlungssicherheit stellt die Fluoreszenzdiagnostik nach topischer Applikation von ALA dar [Lang et al., 2000; Szeimies et al., 2000]. Die ALA zeichnet sich durch eine stärkere Selektivität für neoplastisch verändertes Gewebe als die bisher eingesetzten Porphyrinderivate aus, und durch die topische Applikation, in Form einer Creme oder eines Gels, tritt keine systemische Photosensibilisierung auf [Fritsch et al., 1996].

Klinische Studien ergaben, dass die topische Fluoreszenzdiagnostik bei malignen Hautveränderungen eine höhere Fluoreszenzintensität als im angrenzenden unveränderten Gewebe hervorruft [Peng et al., 1997]. Die gesteigerte Porphyrinakkumulation in neoplastischem Gewebe wird sowohl auf die Veränderungen der Epidermis als auch auf die erhöhte Proliferationsrate der Hauttumore selbst zurückgeführt [Kennedy et al., 1990]. Andere Hautveränderungen, wie eine Lentigo senilis, Nävuszellnävi oder maligne Melanome weisen aufgrund ihres hohen Pigmentanteils und der dadurch bedingten höheren Lichtabsorption keine Fluoreszenz auf. Das Ausbleiben einer Fluoreszenz in Verrucae vulgares könnte auf die massive Hyperkeratose zurückzuführen sein [Betz et al., 1999, Fritsch et al., 1997].

Die Fluoreszenzdiagnostik ist keine histologische Untersuchung, die eine verlässliche Aussage bezüglich der Dignität einer Hautveränderung ermöglicht. Bedeutung und Vorteil der Fluoreszenzdiagnostik bestehen allein darin, die Grenzen zwischen Tumor und normaler Haut genauer festzulegen und damit die notwendige Behandlung besser planen zu können [Lang et al., 2000]. Insbesondere die exakte Festlegung der Resektionsgrenzen ist aus funktioneller und ästhetischer Sicht von großer Bedeutung, da plastisch-rekonstruktive Maßnahmen im Gesichtsbereich teilweise limitiert sind. Die

histologische Untersuchung der Randschnitte ist jedoch nach wie vor zwingend erforderlich.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen zeigte sich eine klare Fluoreszenz der malignomverdächtigen Hautareale und damit eine gute und reproduzierbare Abgrenzbarkeit zur normalen Haut. Es konnte keine Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und den histologischen Ergebnissen hergestellt werden. Es kam im Fluoreszenzbild zu einer deutlichen Demarkierung der Hautläsionen und damit zu einer besseren Abgrenzbarkeit zur benachbarten gesunden Haut. Darüber hinaus konnten bei einem Patienten mit multiplen senilen Elastosen und aktinischen Keratosen der unbehaarten Kopfhaut mittels der ALAFE zusätzlich zu den klinisch sichtbaren Veränderungen weitere Läsionen nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Fallzahl in der hier vorliegenden Untersuchung und vor dem Hintergrund der großen Variabilität von Hautveränderungen ist eine Aussage zur Wertigkeit der ALAFE nicht möglich. Durch die bessere Demarkierung der Tumorränder scheint dieses Verfahren besonders bei malignen Hautveränderungen eine zusätzliche Sicherheit zu bringen. So konnten bei zwei Plattenepithelkarzinomen weitere, in der Weißlichtendoskopie primär nicht erkennbare Tumorausläufer diagnostiziert und in die Resektion mit einbezogen werden. Die Notwendigkeit von Nachresektionen kann somit vermieden werden.

Nachteilig ist bei diesem Verfahren der erhöhte präoperative Zeitaufwand von insgesamt vier Stunden, wobei innerhalb dieser Zeit zweimal der Verband gewechselt werden muss. Obwohl das Verfahren nebenwirkungsfrei ist, wurde während der Fluoreszenzanregung von einigen der hier untersuchten Patienten ein unangenehmer Schmerzreiz beschrieben [Algermissen et al., 2000].

5.2.2 Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes

Die von Leonhard und Beck beschriebene Fluoreszenzdiagnostik mit Hämatoporphyrinen hat aufgrund der prolongierten Photosensibilisierung, der zu geringen Sensitivitäten, der enormen Kosten für die Geräte sowie des hohen Personalaufwandes keinen Einzug in die klinische Routine gefunden [Leonhard et Beck, 1991]. Mit der ALA-induzierten Fluoreszenzendoskopie liegt nun eine neues

Diagnostikverfahren vor, dessen Wertigkeit bei der Diagnostik von prämaligmem und malignem Gewebe ermittelt werden soll.

Es kamen bei allen untersuchten Patienten die in der WLE sichtbaren Schleimhautveränderungen auch bei der ALAFE zur Darstellung. Endoskopisch zeigten die tumorveränderten Areale eine typische rote Fluoreszenz im Gegensatz zu dem grün-bräunlich erscheinenden gesunden Gewebe. Durch die ALAFE war somit ein besserer Kontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe gegeben. Der beste Fluoreszenzkontrast wird nach 1,5 Stunden erzielt [Leunig et al., 1996b], wenngleich auch bis zu 3 Stunden nach ALA-Applikation eine ausreichende Fluoreszenz erzielt werden konnte.

In einigen Fällen konnte durch die ALAFE eine exaktere Darstellung von Tumorausläufern und -grenzen erreicht werden als dies in der WLE allein möglich war. Dies konnte auch histologisch bestätigt werden. Bei 14 Patienten (entsprechend 9,4 %) konnten durch die Fluoreszenzmarkierung zusätzliche Schleimhautveränderungen detektiert werden, die mit der WLE allein nicht erkannt worden wären. Es handelte sich in 10 Fällen um Leukoplakien (Grad II), bei 2 Patienten um ein Carcinoma in situ und in einem Fall sogar um ein kleines invasives Plattenepithelkarzinom.

Die Ergebnisse der Korrelation zwischen makroskopisch sichtbarer PpIX-Fluoreszenz und histopathologischer Diagnose ergaben Gesamtwerte für die Sensitivität von 91,61 % und für die Spezifität von 68,82 %. Ähnliche Angaben finden sich in den wenigen Literaturmitteilungen [Betz et al., 2002; Leunig et al., 1996b; Mehlmann et al., 1999]. Analysiert man diese Zahlen hinsichtlich der unterschiedlichen Lokalisationen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege, so zeigen sich für den Larynx die besten Ergebnisse (Sensitivität: 98 %; Spezifität: 70 %), während die Untersuchung des Hypopharynx weniger aussagekräftig erscheint. Insbesondere in Pharynx und Hypopharynx wirken sich die verschiedenen Störfaktoren aus, die im Kapitel 5.3 eingehend diskutiert werden. Dennoch verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse, dass die ALA-gestützte Fluoreszenzendoskopie die Weißlichtendoskopie ergänzen kann und dass mit der Kombination beider Techniken die diagnostische Trefferquote im Sinne einer Früherkennung von Schleimhautveränderungen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege erhöht wird [Betz et al., 1997; Mehlmann et al., 1999, Leunig et al., 2000a].

5.2.3 Rezidivierende respiratorische Papillomatose

Die rezidivierende respiratorische Papillomatose (RRP) der Schleimhäute der oberen Luftwege wird durch humane Papillomviren (HPV) verursacht. Trotz fehlender Malignität ist die RRP durch ihren Verlauf für die Patienten sehr belastend, in seltenen schweren Fällen sogar lebensbedrohlich. Das zum Teil sehr rasch fortschreitende Papillomwachstum kann zu einer Verlegung der Atemwege mit lebensbedrohlicher Luftnot führen. Häufig ist dann eine Tracheotomie erforderlich. In den zum Teil jahrzehntelangen Krankheitsverläufen kann es in seltenen Fällen auch zur malignen Entartung der betroffenen Schleimhautareale kommen [Rehberg et Kleinsasser, 1999]. Die Viren sind bei erkrankten Patienten auch in der klinisch intakten Schleimhaut nachweisbar, was das Auftreten von Rezidiven auch nach makroskopisch vollständiger Entfernung der Papillomherde erklärt [Steinberg et al., 1983].

Die im Kleinkindalter und jugendlichen Alter vorkommenden Papillome (juvenile Larynx- und Trachealpapillomatose) ist stets als gutartig anzusehen. Im Gegensatz dazu sind die im Erwachsenenalter erstmalig auftretenden, meist solitär wachsenden Papillome (senile Papillome) als obligate Präkanzerose anzusehen [Rehberg et Kleinsasser, 1999]. Trotz des charakteristischen Endoskopiebefundes können die Papillome nicht sicher von malignen Epithelveränderungen abgegrenzt werden.

Bis heute fehlt eine primär kurative Therapie zur Behandlung der RRP. Konservative Therapiemaßnahmen, wie beispielsweise die systemische Applikation von Interferon oder Cimetidin, haben nur in Einzelfällen zu einem dauerhaften Therapieerfolg geführt [Bergler et Gotte, 2000]. Die symptomatische Abtragung, konventionell oder vorzugsweise CO₂-laserchirurgisch, bleibt somit weiterhin Grundlage der Behandlung [Mahnke, 1995]. Die Rezidivrate wird ganz wesentlich dadurch beeinflusst, ob bei der initialen Laservaporisation alle Papillomareale behandelt worden sind.

In der vorliegenden Untersuchung wurden bei insgesamt 12 Patienten histologisch benigne Papillome nachgewiesen. Alle Papillome zeigten in der ALAFE eine ausgeprägte, gut reproduzierbare Rotfluoreszenz. Im Vergleich zu Plattenepithelkarzinomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades zeigten die Papillome eine deutlich stärker Fluoreszenz. Insbesondere im Larynx konnte die sehr

gute Kontrastierung und Demarkierung zur Detektion von in der WLE nicht eindeutig sichtbaren Papillomherden genutzt werden.

Die starke Fluoreszenz der gutartigen Papillome ist möglicherweise durch deren schnelle Wachstumsrate bedingt, wobei andere gutartige Veränderungen, wie Polypen oder Phonationsverdickungen, keine spezifische ALA-induzierte Fluoreszenz aufweisen [Leunig et al., 2000c]. Die Fluoreszenzintensität der Papillome zeigte sich als so intensiv, dass makroskopisch keine Abstufung möglich war. Es ist aber von besonderem Interesse, ob dysplastische Papillome eventuell eine etwas abgeschwächte Fluoreszenz zeigen.

Aufgrund der vorliegenden hohen Sensitivität von bis zu 100 % scheint der ALA-Fluoreszenzendoskopie bei der RRP aus diagnostischer und auch therapeutischer Sicht eine gesteigerte Bedeutung zuzukommen. Wie bereits erwähnt, ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche endoskopische CO₂-Laserbehandlung die möglichst vollständige Erkennung aller papillomatösen Schleimhautveränderungen. Dennoch ist die Rezidivrate hoch [Feyh, 1995; Mahnke, 1995]. Mit der ALA-induzierten Fluoreszenzendoskopie können auch vereinzelte, in der Weißlichtendoskopie primär nicht erkennbare, Papillomherde sicher erkannt und somit anschließend gezielt laserchirurgisch vaporisiert werden.

So konnten Lippert und Mitarbeiter [2001] bei 16 an einer RRP erkrankten Patienten eindeutig eine bessere Demarkierung der bereits in der Weißlichtendoskopie erkennbaren Papillome nachweisen [Lippert et al., 2001]. Darüber hinaus ließen sich in 12 Fällen zusätzliche, in der Weißlichtendoskopie primär nicht sichtbare Papillomherde aufdecken. Durch die weitgehend vollständige Laser-Behandlung aller Papillomherde konnte bei diesen Patienten das Zeitintervall zwischen den einzelnen Behandlungen verlängert und die Rezidivrate insgesamt reduziert werden [Külkens et al., 2001]. Auch bei Kleinkindern, die überwiegend von dieser Erkrankung betroffen sind, kann die ALAFE bedenkenlos angewendet werden [Leunig et al., 2000c]. Darüber hinaus kann das Verfahren mit der photodynamischen Therapie kombiniert werden. Erste Behandlungsergebnisse sind ermutigend [Lippert et Werner, 2002].

5.2.4 AF und ALAF im Vergleich

Endogene Fluorophore, wie Flavine, Porphyrine, Elastin und Kollagen sind nach Lichtanregung für die Autofluoreszenz des Gewebes verantwortlich. Bis auf die Porphyrine zeigen die genannten Fluorophore eine Fluoreszenzemission im grünen Spektralbereich. Die Strukturproteine Elastin und Kollagen sind vor allem im Bindegewebe und der Submukosa lokalisiert, während die Schleimhaut weitgehend frei ist davon. Folglich führt eine Verdickung der Schleimhaut in prämaligen oder malignen Läsionen zu einer Abschwächung der Fluoreszenz, die von den Strukturproteinen in der Submukosa kommt [Abels et al., 2000; Koenig et al., 1996; Schomacker et al., 1992].

Bei allen untersuchten Patienten kamen die in der WLE sichtbaren Schleimhautveränderungen auch bei der AF-Endoskopie durch Abschwächung der typischen Grünfluoreszenz zur Darstellung. Insgesamt zeigte sich in der AFE ein besserer Kontrast und damit eine bessere Abgrenzbarkeit. Allerdings sind die Ergebnisse der AF-Untersuchungen bezüglich der Lokalisation der Tumoren als sehr unterschiedlich einzuordnen. Es konnten im Bereich des Larynx, des weichen Gaumens und des Mundbodens bessere Fluoreszenzkontraste erzielt werden als an der Zunge. Die Fluoreszenzunterschiede sind am ehesten bedingt durch den unterschiedlichen Aufbau der Gewebe. So weist beispielsweise der harte Gaumen ein im Vergleich zur Zunge deutlich höheren Gehalt an Kollagenfasern auf. Zudem sind noch interindividuelle Unterschiede zu berücksichtigen [Betz et al., 1999]. Die genannten Gründe können möglicherweise die geringe Nachweisrate der AFE von 43,3 % bei Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx erklären [Betz et al., 1999]. Ebenso zeigten sich Unterschiede bei der Tumorgröße. So konnten in der AFE flache, auf das Epithel beschränkte, nicht verhornte Läsionen besser lokalisiert werden als große exophytische Tumoren [Betz et al., 2002].

Anhand der Autofluoreszenz-Endoskopie ist es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, eine eindeutige Zuordnung der Schleimhautveränderungen bezüglich ihrer Dignität zu machen, auch wenn in vergleichenden Untersuchungen zur Weißlichtendoskopie eine größere Sensitivität bei der Früherkennung von Malignomen erzielt werden konnte [Arens et al., 1997; Betz et al., 1997; Gillenwater et al., 1998a; Leunig et al., 1996a et 2000a; Mahlzahn et al., 2002; Žargi et al., 1997 et 2000]. Das

maximale Verhältnis von 3,5:1 für Fluoreszenzintensitäten zwischen Normal- und Tumorgewebe kann alleine als nicht zufriedenstellend für eine exakte Tumordetektion angesehen werden, so dass weiterhin morphologische Gewebekriterien hinzugezogen werden müssen [Arens et al., 1999; Betz et al., 1999].

Der diagnostische Zugewinn der AF-Endoskopie wird durch verschiedene Faktoren reduziert. Einblutungen oder Blutauflagerungen an der Schleimhaut führen bei der AFE zu falsch-positiven Befunden, bei der ALA-induzierten Endoskopie zu falsch-negativen Ergebnissen. Stark hyperämische Areale, die typisch bei einer Laryngitis acuta auftreten, können in der AFE zu einer falsch-positiven Fluoreszenzabschwächung führen [Žargi et al., 2000]. Auch Narben bedingen eine Reduktion der Fluoreszenz [Malzahn et al., 2002]. Leukoplakien emittieren ein strahlenderes Fluoreszenzbild als die gesunde Umgebung, obwohl diese durch eine dünne Hornschicht abgedeckt sind und somit eine Abschwächung der Fluoreszenz zu erwarten wäre.

Im Vergleich zwischen der AF-Endoskopie und der ALA-induzierten Endoskopie scheint das letztere Verfahren hinsichtlich der zukünftigen Bedeutung gewisse Vorteile zu haben und wird derzeit größtenteils favorisiert [Betz et al., 2002]. Eine eigene Beurteilung ist aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Patienten mit beiden Methoden nicht möglich. Es scheint jedoch mit der ALAFE eine deutlichere Kontrastierung gegeben zu sein [Arens et al., 1997]. Die AF-Endoskopie zeichnet sich andererseits besonders durch ihre einfache Handhabung aus, da keine medikamentöse Sensibilisierung erforderlich ist, die Untersuchung jederzeit und beliebig wiederholt werden kann und dieses Verfahren keine Nebenwirkungen aufweist.

Delank empfiehlt daher bei jeder Mikrolaryngoskopie die routinemäßige Durchführung der AFE als ergänzendes Diagnostikum, da hierdurch die Gesamt-Sensitivität gesteigert werden kann. Aufgrund der geringen Spezifität und der großen individuellen Unterschiede erscheint der Einsatz jedoch nur in der Hand von erfahrenen Untersuchern sinnvoll zu sein [Delank et al., 2000; Fryen et al., 1997].

5.2.5 Nebenwirkungen der Fluoreszenzendoskopie

In Übereinstimmung mit den Literaturmitteilungen traten bei den durchgeführten Autofluoreszenz- und ALA-induzierten Fluoreszenzendoskopien keine Nebenwirkungen auf [Rick et al., 1997]. Phototoxische Erscheinungen der Haut (Erytheme) in Form eines „Sonnenbrandes“ konnten bei allen Patienten, bei denen eine ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie durchgeführt wurde, vermieden werden. Aufgrund des theoretischen Risikos wurden jedoch alle Patienten im Anschluss an die Fluoreszenzuntersuchung prophylaktisch für 24 Stunden vor einer direkten Sonneneinstrahlung geschützt.

Es ist in der Literatur beschrieben, dass Hautreaktionen erst nach systemischer Verabreichung höherer Dosen ALA (40 mg/kg KG) auftreten. Es werden dabei maximale ALA-Plasmaspiegel von 35 mg/l erreicht. Es können innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation bei einem Teil der Patienten phototoxische Hautveränderungen auftreten [Fan et al., 1996; Fromm et al., 1996; Grant et al., 1993a; Regula et al., 1995; Gossner et al., 1995; Kriegmair et al., 1996; Mlkvy et al., 1995a et 1995b], wie sie auch bei bestimmten Formen der Porphyrrie beobachtet werden [Doss 1987]. Bei der lokalen Applikation sind die Plasmaspiegel für ALA und deren Abbauprodukte so gering [Lippert et al., 2002], dass oben beschriebene Nebenwirkungen praktisch ausgeschlossen werden können.

Bei der ALA-induzierten Fluoreszenzdiagnostik von Hautveränderungen berichtete die Mehrzahl der Patienten über gewisse Schmerzen. Diese unangenehme Begleiterscheinung wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Algermissen et al., 2000]. Der Schmerz kann durch Applikation von Lokalanästhetika in Form von Emla-Creme® oder einer Infiltrationsanästhesie ausgeschaltet werden [Dellian et Kastenbauer, 2000, Cairnduff et al., 1994]. Allerdings führt die zusätzliche Einbringung von Substanzen zu einer Begünstigung von Artefakten und damit zu einer negativen Beeinflussung des Endoskopieergebnisses.

Im Gegensatz zur topischen ALA-Applikation ist nach Zufuhr hoher oraler ALA-Dosen (60 mg/kg KG) bekannt, dass ca. 30 % der Patienten über deutliches Unwohlsein, Übelkeit und Erbrechen klagten [Fan et al., 1996; Mlkvy 1995a et 1995b; Regula et al., 1995]. Die akut intermittierende Porphyrrie und anderen Porphyrriformen können zu

einer erhöhten Inzidenz von Leberzelltumoren führen [Anderson et al., 1996; Kauppinen et Mustajoki, 1988; Siersema et al., 1992,]. Für die einmalige orale Anwendung von ALA scheint das mögliche kanzerogene Potential jedoch unerheblich zu sein, da ALA nach Verabreichung nur kurzzeitig (< 24 Stunden) im Plasma nachweisbar ist [Webber et al., 1997; Lippert et al., 2002] und damit der epidemiologisch beschriebene Zusammenhang zwischen Expositionsdauer hoher ALA-Plasmaspiegel bei Porphyrrie sowie möglicher kanzerogener Co-Faktoren nicht gegeben ist. Zudem ist zu berücksichtigen, dass toxische Substanzen, die eine Porphyrrie hervorrufen können, auch eine eigene Kanzerogenität aufweisen können [Doss 1979]. Als Nebenwirkung nach systemischer hochdosierter ALA-Gabe ist jedoch die passagere Leberschädigung beschrieben [Grant et al., 1993a].

5.3 Störfaktoren der Fluoreszenzdiagnostik

5.3.1 Technische Aspekte

In diesem Abschnitt sind einige technische Aspekte zusammengefasst, die die Aussagekraft der Fluoreszenzdiagnostik beeinträchtigen können. Das Ergebnis der Fluoreszenz wird ganz wesentlich von der optimalen Lichtanregung, d.h. Ausleuchtung des zu untersuchenden Schleimhautareals, beeinflusst. So zeigte sich bei den initial verwendeten konventionellen 0°-Geradeaus-Optiken, auf die ein BeobachtungsfILTER aufgesetzt werden musste, vielfach ein zu dunkles Untersuchungsbild mit nur eingeschränkter Aussagekraft der Fluoreszenz. Insbesondere war eine ausreichende Ausleuchtung der Mundhöhle und des Pharynxschlauches nicht gegeben. Durch gezieltes Einbringen von dunklen Abdecktüchern im Sinne einer Totraumverkleinerung (z.B. der Mundhöhle oder Hypopharynx) konnte auch eine Zunahme der Lichtstärke im Untersuchungsbild erzielt werden. Durch den Einsatz der neuen Endoskope mit integriertem BeobachtungsfILTER wurde eine deutlich bessere Ausleuchtung der Schleimhaut möglich, wobei auch weiterhin auf die Vermeidung von Fremdlichteinfall geachtet werden muss.

Desweiteren wird die Qualität der Fluoreszenz von der Beleuchtungsintensität beeinflusst. Die Verwendung eines speziell für die Fluoreszenzendoskopie hergestellten Lichtleiters ist zur Vermeidung erheblicher Lichtverluste essentiell. Die Helligkeit des

Endoskopbildes ist abhängig von der Beleuchtungsstärke. Diese nimmt mit dem Abstand des Endoskopes zum Gewebe quadratisch ab. Entsprechendes gilt für die Lichtmenge, die vom Gewebe wieder reflektiert und über die Optik aufgenommen wird. Diese quadratische Abstandsabhängigkeit bedeutet, dass eine Verdopplung des Beobachtungsabstandes eine Reduktion der Bildhelligkeit des gesamten Gesichtsfeldes auf ein Viertel der ursprünglichen Helligkeit bewirkt [Baumgartner et al., 1996]. Es vergrößert sich auch das durch das Endoskop beobachtete Gesichtsfeld mit dem Abstand quadratisch. Die Verringerung des Beobachtungsabstandes bewirkt also eine verbesserte Bildhelligkeit jedoch nur für die Inspektion eines reduzierten Bildausschnittes. Für kleine Schleimhautläsionen ist dies unerheblich. Jedoch können größere und flächig gewachsene Karzinome aus diesen Gründen nur in mehreren Teilansichten vollständig beurteilt werden.

5.3.2 Lichtabsorption durch Blut

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes zeichnen sich durch eine hohe Vulnerabilität aus. Teilweise kommt es bereits durch minimalste Berührungen der Tumoroberfläche zu einer Sicker- oder Schmierblutung, die den Tumor und die umgebende Schleimhaut benetzt. Trotz besonderer Sorgfalt während der Untersuchung lassen sich derartige kleine Blutungen insbesondere bei größeren, teils ulzerierenden Tumoren nicht vermeiden. Nach erfolgter Strahlentherapie ist die Schleimhaut oft sehr berührungsempfindlich, so dass in diesen Fällen auch bei kleinen Läsionen bereits Schmierblutungen auftreten können. Durch die starke Absorption des Lichtes und durch das die Schleimhaut bedeckende Blut wird die Fluoreszenz völlig ausgelöscht. Im Fluoreszenzmodus erscheinen diese Areale schwarz und es ist keine diagnostische Aussage möglich [Leunig et al., 1996b; Lippert et al., 2000].

Aus diesem Grund kommt dem Untersuchungsablauf eine besondere Bedeutung zu. Erst nach Abschluss der Fluoreszenzendoskopie mit Videodokumentation des Tumors und insbesondere der Tumorränder ist es daher sinnvoll, die Gewebeproben zur histologischen Untersuchung zu entnehmen. Sollten dennoch kleinere Blutungen auftreten, so kann durch Einlage von Epinephrin-getränkter Watte rasch eine lokale Blutstillung erzielt werden, die dann eine weitere Fluoreszenzuntersuchung ermöglicht.

5.3.3 Photobleaching (Ausbleichen)

Ein weiteres Problem der Fluoreszenzdiagnostik stellt das Ausbleichen, das sogenannte Photobleaching dar. Unter Ausbleichen wird die Abnahme der Fluoreszenz eines Stoffes unter Lichteinwirkung verstanden. PpIX wird bei Lichteinfluss chemisch umgesetzt, so dass es zu einer Zerstörung der Tertiärstruktur der Moleküle kommt. Das durch die Bestrahlung mit blauvioletterem Licht ($\lambda=400-410$ nm) angeregte PpIX-Molekül gibt die absorbierte Energie in Form von rotem Licht (Fluoreszenz) an die Umgebung ab. In den Spektralbereichen starker Absorption und Fluoreszenzanregung ist auch das Ausbleichen des Areal am stärksten.

Während des Untersuchungsvorganges ist der Ausbleicheffekt im Fluoreszenzmodus wesentlich stärker als im Weißlichtmodus, weil eine höhere Lichtleistung im Bereich der Hauptabsorptionsbande des PpIX eingestrahlt wird. Da das angeregte PpIX schon vor der Fluoreszenz einen Teil der Anregungsenergie verliert, liegt das Fluoreszenzlicht ($\lambda=635$ nm) bei größerer Wellenlänge als das Anregungslicht ($\lambda=407$ nm). Daraus folgt, dass sich unter Bestrahlung mit Anregungslicht - in vermindertem Umfang auch mit Weißlicht - die PpIX-Fluoreszenzintensität in der Gewebeoberfläche durch den photochemischen Zerfall von PpIX kontinuierlich verringert [Moan et al., 1997]. Darüber hinaus wird die Ausbleichrate von der Bestrahlungsintensität und damit auch vom Bestrahlungsabstand mit beeinflusst. Prinzipiell gilt also auch für das Ausbleichen die quadratische Abstandsabhängigkeit, so dass bei einer Halbierung des Beobachtungsabstandes nur mehr ein Viertel der Beobachtungszeit zur Verfügung steht.

Die Fluoreszenzintensität nimmt in den ersten Sekunden der Bestrahlung exponentiell ab. Bereits nach ca. 20 Sekunden reduziert sich die Rotfluoreszenz unter der Anregungsbestrahlung, so dass nur noch eine eingeschränkte Aussage möglich ist. Nach 60 Sekunden ist eine aussagekräftige Fluoreszenzendoskopie oft nicht mehr durchführbar. Die Ausbleichgeschwindigkeit ist individuell unterschiedlich. Bei der klinischen Anwendung ist dieses Phänomen besonders bei größeren Tumoren problematisch, da in diesen Fällen häufig nur eine geringe Ausgangsfluoreszenz erreicht wird. Der initialen Videodokumentation während des gesamten Untersuchungsganges kommt somit eine entscheidende Bedeutung zu. Aufgrund dieser Erfahrungen hat es sich bewährt, die Untersuchung einerseits möglichst rasch durchzuführen und

andererseits während der Endoskopie frühzeitig in den Fluoreszenzmodus zu wechseln und in dem Weißlichtmodus eine sehr geringere Lichtintensität zu verwenden.

In diesem Zusammenhang soll aber auch darauf hingewiesen werden, dass der Photobleaching-Effekt zur Korrektur einer überschüssigen Fluoreszenz genutzt werden kann. Nach zu langer Inkubation mit ALA kann eine generalisierte Fluoreszenz der gesamten sensibilisierten Haut bzw. Schleimhaut resultieren. Ein Farbkontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe ist zunächst bei der Fluoreszenzanregung nicht möglich, es leuchtet das gesamte Untersuchungsareal rot. In solchen Fällen kann durch eine gezielte, längere Lichtapplikation das Ausbleichen des Gewebes erzielt werden, wobei das Normalgewebe im Vergleich zum Tumor in der Regel schnell abblasst und somit eine Fluoreszenzkontrast entsteht.

5.3.4 Bakterienartefakte

Bereits vor der ALA-Applikation lassen sich in Karzinomen der Mundhöhle stark erhöhte Fluoreszenzintensitäten nachweisen [Leunig et al., 1996b]. Diese spontane, endogene Porphyrinanreicherung an der Tumoroberfläche wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Da an der Oberfläche fluoreszierender Karzinome isolierte Bakterienstämme nicht zu einer reproduzierbaren Fluoreszenz angeregt werden konnten [Sharvill, 1955], wurde für die Herkunft der nachgewiesenen Porphyrinakkumulation nicht eine mikrobielle Superinfektion, sondern der Tumorzellmetabolismus selbst verantwortlich gemacht [Ghadially, 1960].

Im Gegensatz hierzu konnte in späteren Untersuchungen die Hypothese untermauert werden, dass das spontane Fluoreszenzlicht ein Produkt der mikrobiellen Porphyrinsynthese ist und von einer bakteriellen Superinfektion an der nekrotischen Oberfläche von ulzerierten Tumoren resultiert [Ghadially et al., 1963; Harris et Werkhaven, 1987]. In von Tumoren entnommenen Abstrichen konnten unter anderem die stark fluoreszierenden Bakterienstämme *Haemophilus parainfluenzae* sowie *Proteus mirabilis* angezüchtet werden, die beide über eine starke endogene Porphyrinproduktion verfügen [Betz et al., 1997; Luppä et al., 1993]. Die „Bakterien-bedingte“ Fluoreszenz ist über die Tumoroberfläche inhomogen verteilt und reicht somit nicht zur Beurteilung der Tumorausdehnung aus.

Darüber hinaus ist an der Schleimhaut von Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen praktisch immer gegeben. So zeigte sich nach Spülung der Mundhöhle mit ALA nicht nur über den Tumorarealen eine verstärkte Fluoreszenz, sondern auch an der gesunden Schleimhaut. In Übereinstimmung mit Leunig und Mitarbeitern fanden wir als typische Lokalisationen der Bakterienbesiedelung den Zungenrücken, den Gingivarand und auch die Ränder von Zahnkronen [Leunig et al., 1996a 1996b et 2000b].

Die hierdurch bedingte unspezifische Fluoreszenz führt zu einer Einschränkung in der Beurteilbarkeit der Tumorränder sowie der Detektion von kleinen Schleimhautveränderungen. In Kenntnis dieses Artefaktes sollte vor der ALA-Applikation eine antibakterielle und antimykotische Behandlung erfolgen. Durch die prädiagnostische Durchführung einer Mundspülung mit zweiprozentigem Chlorhexidingluconat oder mit verdünntem Wasserstoffperoxid konnten die Beläge deutlich reduziert und die Aussagekraft erhöht werden [Leunig et al., 1996a; Zenk et al., 1999]. Möglicherweise kann auch durch die systemische Applikation von ALA über eine Nährsonde die Bakterienfluoreszenz etwas reduziert werden.

Auch auf der gesunden Haut kann es durch Bakterieneinflüsse zu Artefakten der Fluoreszenz kommen. Diese wird auf die verstärkte Besiedelung mit Porphyrinproduzierenden Propionibakterien im Gesicht und in den Intertrigines zurückgeführt. Eine den Malignomen vergleichbare Rotfluoreszenz sieht man ohne Vorbehandlung nur beim Erythrasma, da *Corynebacterium minutissimum* große Porphyrinmengen bildet [Lucchina et al., 1996]. Zur Optimierung der Fluoreszenzdiagnostik kann in diesen Hautarealen eine Vorbehandlung mit antibiotikahaltigen Cremes vorteilhaft sein.

5.3.5 Variable „Mensch“

Ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der sich störend auf den Ablauf der Untersuchung auswirken kann, ist der Patient selbst. Chronische Magen-Darmerkrankungen, eine manifeste Leberzirrhose oder ein Diabetes mellitus können Einflüsse auf die Resorption, Mikrozirkulation und Clearance des Photosensibilisators ALA haben. Darüber hinaus können Medikamente, wie z.B. Tetrazykline oder auch

Teezusätze wie Johanniskraut oder Bergamotteöl selbst photosensibilisierend wirken. Andererseits vermindern hohe Konzentrationen an Antioxidantien, wie z.B. Vitaminen (Multivitaminsäfte, Antihautalterungscremes) den photosensibilisierenden Effekt [Algermissen et al., 2000]. Im klinischen Alltag sind die genannten Punkte sicher von untergeordneter Bedeutung, jedoch sollte man bei Durchführung der Fluoreszenzdiagnostik mögliche Störeinflüsse kennen.

Auch die individuelle Compliance der Patienten beeinflusst die Ergebnisse der Fluoreszenzdiagnostik. Ungenauigkeiten bei der ALA-Inhalation oder ALA-Spülung wirken sich sehr schnell auf die Qualität der Untersuchung aus. Zuletzt sei auch die Abhängigkeit der Fluoreszenzendoskopie durch den Untersucher selbst genannt. Alle bisher in der Klinik eingesetzten Systeme zur Fluoreszenzendoskopie basieren auf individuellen Erfahrungen des Untersuchers in Bezug auf die Bewertung der Befunde. Daher hängt das Ergebnis nicht nur von klinischen, sondern auch von subjektiven Kriterien ab. Zur Begrenzung möglicher Fehlinterpretationen wurden daher in der vorliegenden Untersuchung die Fluoreszenzendoskopien ausschließlich von einem in der Endoskopietechnik sehr erfahrenen Arzt durchgeführt. Eine Quantifizierung der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten ist prinzipiell möglich, jedoch ist der klinische Einsatz dieser Spektrometer noch nicht realisiert [Leunig et al., 1996b].

5.4 Ausblick

Die Autofluoreszenzendoskopie und ALA-induzierte Fluoreszenzendoskopie können möglicherweise zu einem sehr nützlichen Diagnostikverfahren für die Früherkennung von Schleimhautveränderungen im Bereich der oberen Luft- und Speisewege weiterentwickelt werden. Beide Verfahren sind nicht invasiv, nebenwirkungsfrei, leicht reproduzierbar, schnell durchführbar und für den Patienten wenig belastend. Die Fluoreszenzendoskopie kann ohne großen zusätzlichen apparativen Aufwand in Kombination mit der Weißlichtendoskopie in der klinischen Routine durchgeführt werden. Trotz der bisher sehr erfolgversprechenden Ergebnisse sind weitere Verbesserungen erforderlich.

Neben der weiteren Optimierung der Technik und Evaluierung des klinischen Nutzens bei der Früherkennung von malignen Schleimhautläsionen ist eine Autofluoreszenz oder ALA-gestützte Resektion von Karzinomen anzustreben, wie sie in bestimmten Fällen bereits beim malignen Gliom durchgeführt wird [Stummer et al., 1998]. Möglicherweise können kleinere Karzinome oder deren Vorstufen im Rahmen der ALA-induzierten Diagnostik gleichzeitig photodynamisch behandelt werden.

5.4.1 Optimierung der Methodik

Das Ergebnis der Fluoreszenz wird, wie bereits mehrfach erwähnt, von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Es muss daher das Ziel zukünftiger Bemühungen sein, durch Optimierung der technischen Apparate und durch Modifikation der Behandlungsparameter, die oben genannten Störfaktoren zu minimieren und die Reproduzierbarkeit und Sensitivität dieses Diagnostikverfahrens weiter zu steigern.

Ein zentraler Punkt stellt hierbei sicherlich die Verbesserung der selektiven Aufnahme des Photosensibilisators durch das maligne transformierte Gewebe dar. Durch eine weitere Erhöhung des Verhältnisses der PpIX-Fluoreszenz zwischen Tumor- und Normalgewebe (T/N-Ratio) könnte eine bessere Kontrastierung und damit eine verbesserte Detektion von kleinen Schleimhautläsionen erzielt werden.

Neben der lokalen ALA-Applikation mag in bestimmten Fällen eine systemische Gabe des Photosensibilisator vorteilhaft sein. So ist es beispielsweise bei Pharynx- und Hypopharynxkarzinomen mit Übergang zum Ösophagus nicht möglich, durch Spülung oder Inhalation eine ausreichende Einwirkungszeit des Photosensibilisators zu gewährleisten. Bei diesen Lokalisationen scheint die systemische Applikation notwendig zu sein. Ebenso könnte die Fluoreszenzendoskopie mit systemisch applizierter ALA im Rahmen der Primärtumorsuche beim CUP-Syndrom (Carcinoma of unknown primary) Anwendung finden. Patienten mit einem CUP-Syndrom erkranken an einer manifesten Halslymphknotenmetastase bei zunächst unbekanntem Primärtumor. Da eine systemische ALA-Applikation im Gegensatz zur lokalen Anwendung zu einer Sensibilisierung der gesamten Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes führt, könnte möglicherweise der Primärtumor leichter entdeckt werden.

Der systemische Einsatz ist derzeit nur durch eine enterale Einnahme möglich, wobei der Dosierung durch potentielle Nebenwirkungen eindeutige Grenzen gesetzt sind. Als Nachteil einer oral-systemischen Gabe ist das erhöhte Aspirationsrisiko im Rahmen einer Intubationsnarkose zu nennen, welche bei der Panendoskopie zwingend erforderlich ist. Die von anästhesiologischer Seite empfohlene sechsstündige Flüssigkeitskarenz vor der Allgemeinanästhesie kann dann nicht eingehalten werden. Eine Lösung dieses Problems stellt die intravenöse Applikation dar, bei der zudem eine bessere Steuerbarkeit durch Umgehung des first-past-Effektes gegeben wäre. Bisher liegen jedoch nur tierexperimentelle Daten vor [Kleemann et al., 1996]. Möglicherweise kann dieses Problem durch Fort- bzw. Neuentwicklung anderer Photosensibilisatoren überwunden werden.

Ein weiterer, sehr elementarer Punkt ist die quantitative Erfassung der Fluoreszenz. Zur Zeit basieren alle in der Klinik eingesetzten Systeme zur Fluoreszenzendoskopie auf der individuellen Erfahrung des Untersuchers in Bezug auf die Bewertung der Fluoreszenz. Das Ergebnis wird daher ganz wesentlich von subjektiven Kriterien beeinflusst. Die spektroskopische Aufzeichnung von Fluoreszenzintensitäten über normalen und verdächtigen Schleimhautarealen kann das menschliche Auge bei der Beurteilung unterstützen. Erste Arbeiten zur Spektroskopie bei der Anwendung von ALA sprechen von einer semiquantitativen Fluoreszenzmessung, wobei Leunig et al. ein unterschiedliches Intensitätsverhältnis zwischen gesundem Gewebe und Tumoren von 1:10 feststellen konnten [Leunig et al., 1996b et 2000b]. Inaguma und Hashimoto [Inaguma et Hashimoto, 1999] beschrieben 1999 für Karzinome der Mundhöhle ein reproduzierbares Fluoreszenzspektrum mit einer Hauptbande bei 630 nm, wobei sich typischerweise bei 665 und 690 nm sogenannte „Schulterbanden“ fanden. Dieses Spektrum wurde als „porphyrin-like-spectrum“ bezeichnet. Entsprechend unterschieden die Autoren zwischen einem „porphyrin-typischen-Spektrum“ und „nicht-porphyrintypischen-Spektrum“. Svanberg et al. entwickelten ein „Multi-Colour Fluorescence Imaging“, das zur Erfassung von Tumorgewebe im Sinne einer „optischen Biopsie“ weiterentwickelt werden soll [Svanberg et al., 1998a et 1998b]. Auch für die Autofluoreszenz sind spektroskopische Messungen beschrieben [Betz et al., 1999; Gillenwater et al., 1998a et 1998b; Ingrams et al., 1997, Žargi et al., 2000]. Das Fluoreszenzverhältnis zwischen normaler und maligner Mukosa liegt bei 3,5:1. [Betz et al., 2000]. Allerdings unterscheiden sich die Spektren von Tumor- und Normalgewebe

sehr gravierend [Dhingra et al., 1998; Hung et al., 1991]. Inwieweit durch die spektroskopischen Messungen die Sensitivität erhöht werden kann, muss in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden.

Ein späterer routinemäßiger Einsatz der photodynamischen Diagnostik könnte somit in der sogenannten “optisch unterstützten Biopsie“ liegen

5.4.2 Fluoreszenzdiagnostik als Screeningverfahren

Die Prognose von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege wird ganz wesentlich vom Zeitpunkt der Diagnosestellung beeinflusst. Es muss daher das Ziel sein, maligne Schleimhautveränderungen möglichst früh zu diagnostizieren, bevor die lymphogene Metastasierung eingesetzt hat [Werner et al., 2002b]. Da Patienten bei kleinen Tumoren meist beschwerdefrei sind, kann eine Frühdiagnose nur über eine effektive Vorsorgeuntersuchung erreicht werden. Bei weiterer Optimierung der Fluoreszenzendoskopie wäre der Einsatz als „screening-Verfahren“ denkbar. Die Autofluoreszenzendoskopie wäre hierfür besonders geeignet, da keine Vorbehandlung mit einem Photosensibilisator erforderlich ist. In Anlehnung an die Autofluoreszenzbronchoskopie als Routineverfahren, bei der sich eine deutliche Steigerung der Diagnoserate von Dysplasien gegenüber der Weißlichtendoskopie fand, könnten in der Ambulanz die Schleimhäute der oberen Luft- und Speisewege untersucht werden [Khanavkar et al., 1998]. Zunächst müssten allerdings Risikogruppen definiert werden. Problematisch ist hierbei die Definition der Auswahlkriterien für die zu untersuchenden Patienten. Der chronische Nikotin- und Alkoholabusus, der zur Schädigung der gesamten Schleimhaut der oberen Luft- und Speisewege führt, ist hierbei sicherlich ein zu ungenaues Kriterium. [Braakhuis et al., 2002; Haugerty et al., 1992; Silverman, 1992].

Es wäre daher zu diskutieren, ob die Fluoreszenzendoskopie vermehrt in der Tumornachsorge eingesetzt werden sollte, da für Kopf-Hals-Karzinome bis heute keine verlässlichen Tumormarker zur Verfügung stehen [Werner et al., 2002a], andererseits aber 10-15 % der Patienten im weiteren Krankheitsverlauf ein Zweitkarzinom entwickeln [Braakhuis et al., 2002; Dhooge et al., 1996, Natsugoe et al., 1997; Werner, 1997]. Zudem ist die Beurteilbarkeit der Schleimhaut nach vorangegangener Chirurgie

und/oder Strahlentherapie durch Narben und Ödembildung teilweise deutlich erschwert [Lippert et Werner; 2002; Slaughter et al., 1953]. In diesem Sinne setzen Leunig et al. die ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik zum Therapiemonitoring nach erfolgter Vitamin-A-Behandlung oraler Leukoplakien ein [Leunig et al., 2000d].

5.4.3 Fluoreszenz-gestützte Laserresektion, Photodynamische Therapie

Neben der weiteren Optimierung der Technik und Evaluierung des Nutzens zur Diagnostik von Frühkarzinomen scheint die Verknüpfung von Fluoreszenzdiagnostik mit der gleichzeitigen Tumorbehandlung eine interessante und erfolgversprechende Strategie. Insbesondere die endoskopische CO₂-Laser-Resektion von Karzinomen im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes, die zunehmend das Standardverfahren für begrenzte Karzinome darstellt, könnte optimiert werden [Rudert et al., 1999]. Analog der fluoreszenz-gestützten transurethralen Resektion von Harnblasenkarzinomen [Kriegmair et al., 1999b] ist durch den Einsatz der Autofluoreszenz und ALA-induzierten Fluoreszenz eine erhöhte Genauigkeit bei der Laserresektion von Tumoren der oberen Luft- und Speisewege zu erwarten. Auch bei der Resektion von malignen Gliomen wurde die Kombination von Diagnostik und chirurgischer Resektion in einem Schritt bereits erfolgreich angewendet [Stummer et al., 1998].

Voraussetzung für ein derartiges Vorgehen ist die Integration des Fluoreszenzlichtes einschließlich Filtersystemen in das Operationsmikroskop, mit dem die Laserresektion erfolgt. Technische Probleme, wie eine ausreichende Hohlraumausleuchtung, die Lichtabsorption durch das Nachbargewebe, Fluoreszenzauslöschungen durch Blutung und das Bleaching-Phänomen müssen allerdings noch überwunden werden. Von besonderem Vorteil wäre die Fluoreszenz-gestützte Resektionstechnik bei Stimmlippenkarzinomen, da hier aus funktioneller Sicht möglichst viel Gewebe erhalten werden muss. Desweiteren kann nach erfolgter Tumorresektion das Wundbett fluoreszenz-endoskopisch auf eventuell zurückbelassene Tumoranteile untersucht werden oder nach fluoreszenz-gestützter Resektion kann im selben Behandlungsschritt eine adjuvante photodynamische Therapie (PDT) der Tumorregion erfolgen.

Die PDT ist ein Therapieverfahren, das auf dem Zusammenwirken eines Photosensibilisators mit Laserlicht basiert. Der photodynamische Effekt wurde bereits

zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts beschrieben [Meyer-Betz, 1913; von Tappeiner et Jodlbauer, 1904]. Die photodynamische Wirkung entfaltet sich auf zellulärer Ebene durch Absorption von Licht. Sie führt zu angeregten Energiezuständen des Sensibilisators. Es kommt zu einem Energietransfer auf molekularen Sauerstoff, der dadurch in den sog. Singulett-Sauerstoff übergeführt wird. Diese Sauerstoffradikale sind in der Lage, lebenswichtige Zellstrukturen durch Photooxidation zu zerstören. [Dougherty et al., 1975].

Die exogene Zufuhr von ALA führt zur intratumoralen Akkumulation von PpIX, das einerseits zu Fluoreszenz angeregt werden kann, andererseits nach Laserlichtanregung auch phototoxisch wirkt [Divaris et al., 1990; Kennedy et Pottier, 1992; Riesenberger et al., 1996]. Dieser zusätzliche phototoxische Effekt kann gezielt zu therapeutischen Zwecken genutzt werden. Vorteile der PDT sind eine selektive Zerstörung des Tumorgewebes bei Erhalt und weitgehender Schonung der gesunden Umgebung, die geringe Invasivität sowie eine geringe Narbenbildung. Dies ist insbesondere in der Kopf-Hals-Region aus funktionellen Gesichtspunkten von besonderer Bedeutung. Zudem ist im Gegensatz zur Strahlentherapie eine Wiederholung der Behandlung möglich [Biel, 1996 et 1998; Edge et Carruth, 1988].

Üblicherweise wird die PDT mit Hämatoporphyrinderivaten durchgeführt, die als Nachteil eine prolongierte generalisierte Photosensibilisierung aufweisen [Schweitzer 1990; Wenig et al., 1990]. Im Vergleich dazu ist die durch ALA hervorgerufene Lichtempfindlichkeit mit nur 8-24 Stunden [Svanberg et al., 1993] deutlich kürzer, so dass keine relevanten Nebenwirkungen zu erwarten sind. Erste Ergebnisse mit der ALA-induzierten PDT im Kopf-Hals-Bereich sind erfolgversprechend. Insbesondere für Tumore der äußeren Gesichtshaut wurden gute Remissionsraten erzielt [Cairnduff et al., 1994; Calzavara-Pinton, 1995; Fink-Puches et al., 1998; Fritsch et al., 1998a et 1998b; Hürlimann et al., 1998; Kennedy et Pottier, 1992; Svanberg et al., 1994; Szeimies et al., 1996a et 1996b; Wolf et al., 1993; Wolf, 1999]. Für Schleimhauttumoren liegen nur wenige Literaturmitteilungen vor, wobei auch hier der therapeutische Effekt nachweisbar ist [Dilkes et al., 1995; Fan et al., 1996; Gossner et al., 1999; Grant et al., 1993a et 1993b; Heinritz et al., 1995; 1993a et 1993b; Kennedy et al., 1996; Kübler et al., 1998; Peng et al., 1997].

Besonders bewährt hat sich die ALA-induzierte Fluoreszenzdiagnostik mit anschließender PDT bei der Behandlung der rezidivierenden respiratorischen Papillomatose (RRP). Trotz fehlender Malignität ist die virus-induzierte RRP durch ihren Verlauf für die Patienten sehr belastend, in seltenen schweren Fällen sogar lebensbedrohlich. Die Viren sind bei erkrankten Patienten auch in der klinisch intakten Schleimhaut nachweisbar, was das Auftreten von Rezidiven auch nach makroskopisch vollständiger Entfernung der Papillomherde erklärt [Steinberg et al., 1983]. Bis heute fehlt eine primär kurative Therapie zur Behandlung der RRP. Die symptomatische Abtragung, konventionell oder vorzugsweise CO₂-laserchirurgisch, bleibt weiterhin Grundlage der Behandlung.

Bei der mit ALA durchgeführten PDT und der RRP hat sich folgendes Konzept bewährt. Die Patienten erhalten ca. 2 Stunden präoperativ 20-40 mg/kg KG ALA per os. In einem ersten Schritt wird die verstärkte Anreicherung des Protoporphyrin IX in den Papillomzellen zur Durchführung einer Fluoreszenzendoskopie von Larynx und Tracheobronchialsystem genutzt. Mit Hilfe der Fluoreszenzendoskopie lassen sich die vom Papillomwachstum betroffenen Schleimhautareale sicher detektieren [Lippert et al., 2000]. In Kenntnis der nur geringen Eindringtiefe des Anregungslichtes bei 630 nm erfolgt anschließend die CO₂-laserchirurgische Exzision/Vaporisation der Papillome. Die PDT schließt sich nach makroskopisch vollständiger Papillomentfernung und Abwischen der Karbonisationsrückstände an. Die Laserlichtbestrahlung des Wundbettes und der angrenzenden Schleimhaut erfolgt über zylindrisch abstrahlende Laserfasern mit einer Gesamtenergiedosis von 100 J/cm² [Thurner et al., 2001].

Die mit diesem Behandlungskonzept erzielten Ergebnisse sind sehr zufriedenstellend. Bei insgesamt 18 Patienten konnten Lippert und Werner eine deutliche Reduktion des Papillomwachstums und eine Abnahme der Rezidivhäufigkeit erzielen [Lippert et Werner, 2002]. 12 Patienten sind bei einem Mindestbeobachtungszeitraum von 7 Monaten rezidivfrei. Unerwünschte Nebenwirkungen traten bisher nicht auf. Auch andere Arbeitsgruppen berichten über z.T. sehr zufriedenstellende Ergebnisse [Burian, Univ.-HNO-Klinik Wien, persönliche Mitteilung]

Vor dem Hintergrund der an unterschiedlichen Organen beschriebenen PDT papillomatöser Erkrankungen [Fehr et al, 2000; Ross et al, 1997; Schmidt et al 1996],

ist die Fluoreszenzendoskopie mit anschließender PDT auch beim invertierten Papillom der Nasennebenhöhlen zu diskutieren, da hier ebenfalls eine hohe Rezidivrate vorliegt und konventionelle Resektionen limitiert sind.

6 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund einer seit Jahrzehnten nahezu unveränderten Mortalität von Kopf-Halskarzinomen ist die Suche nach verbesserten Diagnose- und Therapiekonzepten unverändert aktuell. Entscheidend für die Verbesserung der Prognose ist eine möglichst frühzeitige Erkennung der Karzinome bzw. deren Vorstufen. Die Phasen der Karzinogenese erstrecken sich über Jahre, bis ein invasives Wachstum vorliegt. Ziel ist es, diese Zeitspanne für eine sichere Früherkennung der Karzinomvorstufen zu nutzen, aber auch die Tumorausläufer von bereits manifesten Karzinomen genauer zu erfassen und somit eine sichere und vollständige Tumoresektion zu gewährleisten.

Die Aminolaevulinsäure- (ALA-) induzierte Fluoreszenzdiagnostik scheint eine vielversprechende Methode auf diesem Weg der Früherkennung zu sein. Bei der Substanz ALA handelt es sich um ein Hämatoporphyrinderivat, welches nach lokaler oder systemischer Applikation verstärkt in den Tumorzellen akkumuliert. Durch Umbauprozesse wird Protoporphyrin IX gebildet. Dieser Farbstoff fluoresziert unter Anregung von blauem Licht rot. Nach vielversprechenden Ergebnissen in der Pulmologie und Urologie liegen in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde bis jetzt nur Untersuchungen für die Mundhöhle mit kleinen Fallzahlen vor. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der Fluoreszenzdiagnostik nach topischer Applikation von ALA bei malignen Veränderungen im Kopf-Halsbereich ein klinischer Stellenwert zukommt.

Im Zeitraum von 1999 –2001 wurden 150 Patienten mit Schleimhautveränderungen der oberen Luft- und Speisewege sowie mit Läsionen der Gesichts- und Kopfhaut untersucht. Die ALA-Applikation erfolgte jeweils topisch. Insgesamt spülten 20 Patienten mit Veränderungen der Mundhöhle und 31 mit Veränderungen des Oropharynx den Wirkstoff. Vierzehn Patienten mit Hypopharynx- und 69 Patienten mit Larynxläsionen inhalierten die Substanz ALA. Bei den Patienten mit Veränderungen der Gesichts- und Kopfhaut erfolgte die Applikation von ALA durch eine Creme. Der gewonnene Endoskopiebefund wurde abschließend mit dem definitiven Histologiebefund korreliert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind grundsätzlich als sehr positiv zu bewerten. Durch die Aminolävulinsäure-Fluoreszenz-Endoskopie (ALAFE) war ein besserer

Kontrast zwischen Tumor- und Normalgewebe gegeben. In einigen Fällen konnte durch die ALAFE gegenüber der Weißlichtendoskopie (WLE) eine exaktere Darstellung von Tumorausläufern und –grenzen erreicht werden. Bei 14 Patienten (9,4 %) konnten zusätzliche, primär in der WLE nicht erkennbare Schleimhautveränderungen detektiert werden. Hierbei handelte es sich um zwei Carcinoma in situ, um ein invasives Karzinom, um ein Zweitkarzinom des Ösophagus und um zehn Dysplasien zweiten Grades. Die Sensitivität betrug entsprechend 91,61 %, die Spezifität 68,82 %. Unter den gutartigen Schleimhautveränderungen zeigten ausschließlich die Papillome eine klare kontrastreiche Fluoreszenz. Im Bereich der Gesichts- und Kopfhaut kam es im Fluoreszenzbild zu einer deutlichen Demarkierung der Hautläsionen und damit zu einer besseren Abgrenzung zur gesunden Haut. Eine Korrelation zur Dignität und Histologie bestand nicht. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Die ALAFE stellt eine sehr wertvolle Bereicherung für die Früherkennung von Schleimhautveränderungen der oberen Luft- und Speisewege dar. Das Verfahren ist nicht invasiv, nebenwirkungsfrei und somit für den Patienten wenig belastend. Es kann ohne zusätzlichen apparativen Aufwand in Kombination mit der WLE durchgeführt und somit in die klinische Routine integriert werden. Bei der Durchführung treten derzeit noch verschiedene Störfaktoren auf, die eine zuverlässige Beurteilung teilweise einschränken.

Ziel zukünftiger Untersuchungen ist es, neben der weiteren Optimierung der Technik und Evaluierung des klinischen Nutzens bei der Früherkennung von malignen Schleimhautläsionen zusätzlich eine ALA-gestützte Resektion von Karzinomen anzustreben. Möglicherweise können kleinere oder sehr oberflächlich gewachsene Karzinome sowie Schleimhautveränderungen bei der Papillomatose im Rahmen der ALA-induzierten Diagnostik gleichzeitig photodynamisch behandelt werden, wodurch sich neben der Diagnostik auch die Therapie maligner Erkrankungen grundlegend verbessern ließe.

7 Abkürzungen:

ALA: Aminolävulinsäure

ALAF: Aminolävulinsäure-Fluoreszenz

ALAFE: Aminolävulinsäure-Fluoreszenz-Endoskopie

AF: Autofluoreszenz

AFE: Autofluoreszenz-Endoskopie

AF-Modus: Autofluoreszenzmodus

CCD-Kamera: Charge Coupled Device Kamera

Cis: Carcinoma in situ

CUP: Carcinoma of unknown primary

Häm: Hämoglobin

HpD: Hämatoporphyrinderivate

HPV: Human Papilloma Virus

PDD: Photodynamische Diagnostik

PDT: Photodynamische Therapie

PpIX: Protoporphyrin IX

WL: Weißlicht

WLE: Weißlicht-Endoskopie

8 Literatur:

1. Abels, C., Bäumler, W., Landthaler, M., Seimes, R.M.:
Evaluierung neuer Photosensibilatoren für die Photodynamische Therapie in vitro und in vivo.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 93-98
2. Alfano, R.R., Tata, D.B., Cordero, J., Tomashefsky, P., Longo, F.W., Alfano, M.A.:
Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue.
IEEE J Quant Electron QE-20; 1507-1511 (1984)
3. Algermissen, B., Urban, P., Philipp, C.M., Berlien, H.P.:
Störeinflüsse in der Photodynamischen Therapie (PDT).
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 119-129
4. Andersson, C., Bjersing, L., Lithner, F.:
The epidemiology of hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria.
J Intern Med 240; 195-201 (1996)
5. Arens, C., Malzahn, K., Dias, O., Andrea, M., Glanz, H.:
Endoskopische bildgebende Verfahren in der Diagnostik des Kehlkopfkarzinoms und seiner Vorstufen.
Laryngorhinootologie 78; 685-691 (1999)
6. Auler, H., Banzer, G.:
Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren.
Z Krebsforschung 53; 65-68 (1942)
7. Batlle, A.M.:
Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for carcinogenesis.
J Photochem Photobiol B 20; 5-22 (1993)
8. Baumgartner, R., Kriegsmair, M., Jocham, D., Hofstetter, A., Huber, R., Karg, O., Häussinger, K.:
Photodynamic diagnosis (PDD) of early stage malignancies-preliminary results in urology and pneumology.
In: Mang, T. S. (Hrsg.): Physiological Monitoring and Early Detection Diagnostic Methods, Proc. SPIE, 1641 107-112 (1992)
9. Baumgartner, R., Huber, R.M., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., Leberig, A., Roth, C.:
Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer.

10. Bergler, W.F., Gotte, K.:
Current advances in the basic research and clinical management of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis.
Eur Arch Otorhinolaryngol 257; 263-260 (2000)
11. Bermudez-Moretti, M., Garcia, S.C., Stella, C., Ramos, E., Batlle, A.E.:
Delta-aminolevulinic acid transport in *saccharomyces cerevisiae*.
Int J Biochem 25; 1914-1924 (1993)
12. Betz, C., Rick, K., Stepp, H., Baumgartner, R., Leunig, A.:
Lokale Applikation von 5-Aminolävulinsäure zur Fluoreszenzdiagnostik von Mundhöhlenkarzinomen.
Lasermmedizin 13; 102-106 (1997)
13. Betz, C.S., Mehlmann, M., Rick, K., Stepp, H., Grevers, G., Baumgartner, R., Leunig, A.:
Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer.
Lasers Surg Med 25; 323-334 (1999)
14. Betz, C., Mehlmann, M., Stepp, H., Grevers, G., Baumgartner, R., Leunig, A.:
Autofluoreszenzdiagnostik für die Früherkennung von Karzinomen der Mundhöhle.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 31-40
15. Betz, C., Stepp, H., Janda, P., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R., Leunig, A.:
A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence of oral cancer diagnosis
In J Cancer 97; 245-252 (2002)
16. Biel, M.A.:
Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancer.
J Clin Laser Med Surg 14; 239-244 (1996)
17. Biel, M.A.:
Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia.
Laryngoscope 108; 1259-1268 (1998)
18. Boring, C.C., Squires, T.S., Tong, T.:
Cancer Statistics, 1993
CA Cancer J Clin 43; 7-26 (1993)
19. Braakhuis, B.J.M., Tabor, M.P., Leemans, C.R., van der Waal, I., Snow, B.G., Brakenhoff, R.H.:
Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions

Head Neck 24; 198-206 (2002)

20. Cairnduff, F., Stringer, M.R., Hudson, E.J., Ash, D.V., Brown, S.B.:
Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolaevulinic acid for
superficial primary and secondary skin cancer.
Br J Cancer 69; 605-608 (1994)
21. Calzavara-Pinton, P.G.:
Repetitive photodynamic therapy with topical δ -aminolevulinic acid as an
appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin
cancers.
J Photochem Photobiol B 29; 53-57 (1995)
22. Dailey, H.A., Smith, A.:
Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with
ferrochelatase.
Biochem J 223; 441-445 (1984)
23. Delank, W., Khanavkar, B., Nakhosteen, J.A., Stoll, W.:
A pilot study of autofluorescent endoscopy for the in vivo detection of laryngeal
cancer.
Laryngoscope 110; 368-373 (2000)
24. Dellian, M., Kastenbauer, E.R.:
Grenzen der Photodynamischen Therapie bei der Behandlung von Karzinomen
der Kopf-Hals-Region.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und
Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 219-225
25. Dhingra, J., Zhang, X., McMillian, K., Kabani, S., Manoharan, R., Itzkan, I., Feld,
M.S., Shapshay, S.M.:
Diagnosis of head and neck precancerous lesions in an animal model using
fluorescence spectroscopy.
Laryngoscope 108; 471-475 (1998)
26. Dhooge, I.J., De Vos, M., Albers, F.W., Van Cauwenberge, P.B.:
Panendoscopy as a screening procedure for simultaneous primary tumors in head
and neck cancer.
Eur Arch Otorhinolaryngol 253; 319-324 (1996)
27. Dilkes, M.G., DeJode, M.L., Gardiner, Q., Kenyon, G.S., McKelvie, P.:
Treatment of head and neck cancer with photodynamic therapy: results after one
year.
J Laryngol Otol 109; 1072-1076 (1995)
28. Divaris, D.X., Kennedy, J.C., Pottiers, R.H.:
Phototoxic damage to sebaceous glands and hair follicles of mice after systemic
administration of 5-aminolevulinic acid correlates with localized protoporphyrin
IX fluorescence.
Am J Pathol 136; 891-897 (1990)

29. Doss, M.:
Classification of porphyrias and secondary coproporphyrinurias.
In: Strik, J and Koeman, J. H. (Hrsg.): Chemical porphyrias in man. Elsevier ,
Amsterdam 1979, S. 223
30. Doss, M.:
Krankheiten und Störungen der Porphyrin- und Hämsynthese.
In: Lehrbuch der Inneren Medizin, Schattauer Verlaug, Stuttgart-New York,
1987; 849-862
31. Dougherty, T.J., Grindey, G.B., Fiel, R., Weishaupt, K.R., Boyle, D.G., :
Photoradiation therapy. Cure animal tumors with hematoporphyrin and light.
J Natl Cancer Inst 55; 115-121 (1975)
32. Dougherty, T.J., Marcus, S.L.
Photodynamic therapy.
Eur J Cancer 28A; 1734-1742 (1992)
33. Dunn, R., Devine, K.:
Tetracycline-induced fluorescence of laryngeal, pharyngeal and oral cancer.
Laryngoscope 82; 189-198 (1972)
34. Edge, C.J., Carruth, J.A.:
Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancer.
Br J Oral Maxillofac Surg 26, 1-11 (1988)
35. Ell, C., Baumgartner, R., Gossner, L., Häusinger, K., Iro, H., Jocham, D.,
Szeimies, R.M.:
Photodynamische Therapie.
Dt Ärztebl 97; A3337-3343 (2000)
36. El-Sharabasy, M.M., El-Waseef, A.M., Hafez, M.M., Salim, S.A.:
Porphyrin metabolism in some malignant diseases.
Br J Cancer 65; 409-412 (1992)
37. Epstein, J., Scully, C., Spienelli, J.:
Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral
malignant disease and lesions at risk of malignancy.
J Oral Pathol Med 21; 160-163 (1992)
38. Fan, K.F., Hopper, C., Speight, P.M., Buonaccorsi, G., MacRobert, A.J., Bown,
S.G.:
Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and
malignant lesions of the oral cavity.
Cancer 78; 1374-83 (1996)
39. Fan, K.F., Hopper, C., Speight, P.M., Buonaccorsi, G., Bown, S.G.:
Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease in oral cavity.
Int J Cancer 73, 25-32 (1997)

40. Fehr, M., Schwarz, V.A., Simeon, R., Wyss, P.:
Photodynamic therapy of intraepithelial vulvar lesions following topical application of 5-aminolevulinic acid.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 167-183
41. Feyh, J., Gutmann, R., Leunig, A.:
Die photodynamische Lasertherapie im Bereich der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde.
Laryngo Rhino Otol 72; 273-278 (1993)
42. Feyh, J.:
Photodynamic therapy of head and neck tumors.
Adv Otorhinolaryngol 49; 53-57 (1995)
43. Figge, F.H., Weiland, G.S., Maganiello, L.O.:
Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissue for porphyrins and metalloporphyrins.
Proc Soc Exper Biol Med 68, 640-641 (1948)
44. Fink-Puches, R., Soyer, H.P., Hofer, A., Kerl, H., Wolf, P.:
Long-term follow-up and histological changes of superficial nonmelanoma skin cancers treated with topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy.
Arch Dermatol. 134; 821-826 (1998)
45. Fritsch, C., Verwohlt, B., Bolsen, K., Ruzicka, T., Goerz, G.:
Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism.
Arch Dermatol Res 288; 517-21 (1996)
46. Fritsch, C., Stege, H., Saalman, G., Goerz, G., Ruzicka, T., Kurtmann J.:
Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of actinic keratoses.
Photodermatol Photoimmunol Photomed 13; 181-185 (1997)
47. Fritsch, C., Becker-Wegerich, P.M., Menke, H., Ruzicka, T., Goerz, G., Olbrisch, R.R.:
Successful surgery of multiple recurrent basal cell carcinomas guided by photodynamic diagnosis
Aesthetic Plast Surg. 21; 437-439 (1997)
48. Fritsch, C., Lang, K., Neuse, W., Ruzicka, T., Lehmann, P.:
Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology.
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 11; 358-373 (1998a)
49. Fritsch, C., Goerz, G., Ruzicka, T.:
Photodynamic therapy in dermatology.
Arch Dermatol 134; 207-214 (1998b)
50. Fromm, D., Kessel, D., Webber, J.:
Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitization for

- colon cancer.
Arch Surg, 131; 667-669 (1996)
51. Fryen, A., Glanz, H., Lohmann, W., Dreyer, T., Bohle, R.:
Significance of autofluorescence of the optical demarcation of field
cancerisation in the upper aerodigestive tract.
Acta Otolaryngol (Stockh) 117; 316-319 (1997)
 52. Gamarra, F., Hautmann, H., Häußinger, K., Baumgartner, R., Huber, R.M.:
Autofluoreszenz und 5- Aminolävulinsäure induzierte Protoporphyrin IX
Fluoreszenz zur Frühdiagnostik von Tumoren im Bronchialsystem.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und
Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 23-30
 53. Ghadially, F.N.:
Red fluorescence of experimentally induced and human tumours.
J Pathol Bacteriol 80; 345-351 (1960)
 54. Ghadially, F. N., Neish W. J. P.:
Porphyrin fluorescence of experimentally produced squamous cell carcinoma.
Nature 188; 1124 (1960)
 55. Ghadially, F.N., Neish, W.J.P., Dawkins, H.C.:
Mechanisms involved in the production of red fluorescence of human and
experimental tumours.
J Pathol Bacteriol 85; 77-92 (1963)
 56. Gillenwater, A., Jacob, R., Ganeshappa, R., Kemp, B., El-Naggar, A.K., Palmer,
J.L., Clayman, G., Mitchell, M.F., Richards-Kortum, R.:
Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and
native tissue autofluorescence.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124; 1251-1258 (1998a)
 57. Gillenwater, A., Jakob, R., Richards-Kortum, R.:
Fluorescence spectroscopy: a technique with potential to improve the early
detection of aerodigestive tract neoplasia.
Head Neck 20 (6); 556-562 (1998b)
 58. Gluckmann, J.L., Waner, M., Shumrick, K., Peerless, S.:
Photodynamic therapy. A viable alternative to conventional therapy of early
lesions of the upper aerodigestive tract?
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 112; 949-952 (1986)
 59. Gossner, L., Sroka, R., Hahn, E.G., Ell, C.:
Photodynamic therapy: successful destruction of gastrointestinal cancer after
oral administration of aminolävulinic acid.
Gastrointest Endosc 41; 55-58 (1995)
 60. Gossner, L., Ell, C.:
Photodynamische Therapie von Dysplasien und Frühkarzinomen der
Speiseröhre.

Leber Magen Darm 26; 132-137 (1995)

61. Gossner, L., May, A., Sroka, R., Ell, C.:
A new long-range through-the-scope ballon applicator for photodynamic therapy in the esophagus and cardia.
Endoscopy 31; 370-376 (1999)
62. Grant, W.E., Hopper, C., MacRobert, A.J., Speight, P.M., Bown, S.G.:
Photodynamic therapy of orol cancer: photosensitization with systemic amino levulinic acid.
Lancet 342; 147-149 (1993a)
63. Grant, W.E., Hopper, C., MacRobert, A.J., Speight, P.M., Bown S.G.:
Photodynamic therapy of malignant and premalignant lesions in patients with field cancerization of the oral cavity.
J Laryngol Otol 107; 1140-1145 (1993b)
64. Grossweiner, L.I., Hill, J.H., Lobraico, R.V.:
Photodynamic therapy of head and neck squamous cell carcinoma: optical dosimetry and clinical trial.
Photochem Photobiol 46; 911-917 (1987)
65. Harris, D. M., Werkhaven, J.:
Endogenous porphyrin fluorescence in tumors.
Lasers Surg Med 7; 467-472 (1987)
66. Harries, M.L., Lam, S., MacAulay, C., Qu, J., Palic, B.:
Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumors using the helium-cadmium laser.
J Laryngol Otol 109; 108-110 (1995)
67. Haugerty, B.H., Gates, G.A., Arfken, C.L., Harvey, J.:
Meta-analysis of second malignant tumors in head and neck cancer. The case for an endoscopic screening protocol.
Ann Otol Rhinol Laryngol 102; 105-112 (1992)
68. Heinritz, H., Waldfahrer, F., Benzel, W., Sroka, R., Iro, H.:
Meta-Tetrahydroxyphenylchlorin: a new photosensitizer for photodynamic therapy of head and neck tumors.
Adv Otorhinolaryngol 49; 44-47 (1995)
69. Hilal, E.Y.:
Diagnosis of head and neck cancer.
J Med Liban 42; 212-5 (1994)
70. Hillemanns, P., Korell, M., Schmitt-Sody, M., Baumgartner, R., Beyer, W., Kimmig, R., Untch, M., Hepp, H.:
Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid.
Int J Cancer 81; 34-38 (1999)

71. Hiraki, A., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Kurahara, S. Garrod, D.:
Immunohistochemical staining of desmosomal components in oral squamous
cell carcinoma and its association with tumor behaviour.
Br J Cancer 73; 1491-1479 (1996)
72. Hürliemann, A.F., Hänggi, G., Panizzon, R.G.:
Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinomas using topical 5-
aminolevulinic acid in a nanocolloid lotion.
Dermatology 197; 248-254 (1998)
73. Hung, J., Lam, S., Leriche, J.C., Palcic, B.:
Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue.
Lasers Surg Med 11; 99-105 (1991)
74. Iinuma, S., Bachor, R., Flotte, T., Hasan T.:
Biodistribution and phototoxicity of 5-aminolevulinic acid-induced PpIX in an
orthotopic rat bladder tumor model.
J Urol 153; 802-6 (1995)
75. Inaguma, M., Hashimoto, K.:
Porphyrin-like fluorescence in oral cancer.
Cancer 86; 2201-2211 (1999)
76. Ingrams, D.R., Dhingra, J.K., Roy, K., Perrault, D.F. Jr, Bottrill, I.D., Kabani, S.,
Rebeiz, E.E., Pankratov, M.M., Shapshay, S.M., Manoharan, R., Itzkan, I., Feld,
M.S.:
Autofluorescence characteristics of oral mucosa.
Head Neck. 19; 27-32 (1997)
77. Johnson, N., Warnakulasuriy, S., Tavassoli, M. (1996):
Hereditary and environmental risk factors: clinical and laboratory risk markers
for head and neck especially oral, and precancer.
Eur J Cancer Prev 5; 5-17 (1996)
78. Kauppinen, R., Mustajoki, P.:
Acute hepatic porphyria and hepatocellular carcinoma.
Br J Cancer 57; 117-120 (1988)
79. Kennedy, J., Pottier, R., Pross, R.:
Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin, IX:
basic principles and present clinical experience.
J Photochem Photobiol 6; 143-148 (1990)
80. Kennedy, J.C., Pottier, R.H.:
Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for
photodynamic therapy.
J Photochem Photobiol B 6; 275-292 (1992)
81. Kennedy, J.C., Marcus, S.L., Pottier, R.H.:
Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous
photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and

- clinical results.
J Clin Laser Med Surg 14; 289-304 (1996)
82. Kessel, D., Smith, K.:
Photosensitization with derivatives of chlorophyll.
Photochem Photobiol 49; 157-160 (1989)
 83. Khanavkar, B., Gnudi, F., Muti, A., Marek, W., Müller, K.M., Atay, Z., Topalidis, T., Nakhosteen, J.A.:
Grundlagen der LIFE-Autofluoreszenzbronchoskopie.
Pneumologie 52; 71-76 (1998)
 84. Kleemann, D., MacRobert, A.J., Mentzel, T., Speight, P.M., Bown, S.G.:
Photodynamic therapy on the normal rabbit larynx with phthalocyanine and 5-aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX photosensitisation.
Br J Cancer 74; 49-58 (1996)
 85. Kluftinger, A.M., Davis, N.L., Quenville, N.F., Lam, S., Hung, J., Palcic, B.:
Detection of squamous cell cancer and pre-cancerous lesions by imaging of tissue autofluorescence in the hamster cheek pouch model.
Surg Oncol. 1; 183-188 (1992)
 86. Kocher, O., Amaudruz, M., Schindler, A., Gabbiani, G., :
Desmosomes and gap junctions in precarcinomatous and carcinomatous conditions of squamous epithelia; an electron microscopic and morphometrical study.
J submicrosc Cytol 13; 267-281 (1981)
 87. Kolli, V.R., Shaha, A.R., Savage, H.E., Sacks, P.G., Casale, M.A., Schantz, S.P.:
Native cellular fluorescence can identify changes in epithelial thickness in-vivo in the upper aerodigestive tract.
Am J Surg 170; 495-498 (1995)
 88. Koenig, F., McGovern, F.J., Althausen, A.F., Deutsch, T.F., Schomacker, K.T.:
Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer.
J Urol 156; 1597-1691 (1996)
 89. Kondo, M., Hirota, N., Takaoka, T., Kajiware, M.:
Heme-biosynthetic enzyme activities and porphyrin accumulation in normal liver and hepatoma cell lines of rat.
Cell Biol and Toxicol 9; 95-105 (1993)
 90. Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knuechel, R., Steinbach, P., Ehsan, A., Lumper, W., Hofstadter, F., Hofstetter, A.:
Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid.
Urology 44; 836-841 (1994)
 91. Kriegmair, M., Baumgartner, R., Knüchel R., Stepp, H., Hofstädter, F., Hofstetter, A.:
Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin

- fluorescence.
J Urol 155; 105-110 (1996)
92. Kriegmair, M., Zaak, D., Knuechel, R., Baumgartner, R., Hofstetter, A.:
5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy for the detection of
lower urinary tract tumors.
Urol Int 63; 27-31 (1999a)
 93. Kriegmair, M., Zaak, D., Stepp, H., Stepp, H. Baumgartner, R., Knuechel, R.,
Hofstetter, A.:
Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-
aminolevulinic acid.induced fluorescence endoscopy.
Eur Urol 36; 386-392 (1999b)
 94. Kübler, A.C., Haase, T., Rheinwald, M., Barth, T., Mühling, J.:
Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid.
Int J Oral Maxillofacial Surg 27; 466-469 (1998)
 95. Külkens, C., Lippert, B.M., Broßmann, P., Folz, B.J., Werner, J.A.:
Autofluoreszenz-Endoskopie bei tumorösen Veränderungen des Kehlkopfes.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und
Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 41-49
 96. Külkens, C., Werner, J.A., Gross, U., Lippert, B.M.:
5-Delta-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenz: Klinische Evaluation eine
neuen Diagnoseverfahrens bei Tracheobronchialen Papillomen.
Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-
Chirurgie,
72. Jahresversammlung, Hamburg, 23.-27.05.2001
HNO-Inform 25: 128-129 (2001)
 97. Kulapaditharom, B., Boonkitticharoen, V.:
Laser-induced fluorescence imaging in localization of head and neck cancer.
Ann Otol Rhinol Laryngol 107; 241-246 (1998)
 98. Kuropkat C, Plehn S, Herz U, Dunne AA, Renz H, Werner JA.:
Tumor marker potential of serum matrix metalloproteinases in patients with
head and neck cancer.
Anticancer Res 22;2221-2227 (2002)
 99. Lam, S., Palic, B., McLean, D., Hung, J., Korbelik, M., Profio, E.:
Detection of early lung cancer using low dose Photofrin II.
Chest 97; 333-337 (1990)
 100. Lam, S., MacAulay, C., Hung, J.:
Detection of dysplasia and carcinoma in situ using a lung imaging fluorescence
endoscope (LIFE) device.
J Thorac Cardiovasc Surg 105; 1035-40 (1993)
 101. Lang, K., Fritsch, C., Schulte, K.W., Neuse, W., Ruzicka, T., Lehmann, P.:
Möglichkeiten und Grenzen der Fluoreszenzdetektion mit Delta

Aminolävulinsäure-induzierten Porpyrinen (FDAP) bei Hauttumoren.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und
Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S 15-22

102. Langer, S., Abels, C., Botzlar, A., Pahernik, S., Rick, K., Szeimies, R.M., Goetz, A.E.:
Active and higher intracellular uptake of 5-aminolevulinic acid in tumors may be inhibited by glycine.
J Invest Dermatol 112; 723-728 (1999)
103. Leonhard, J., Beck, W.:
Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms.
Laryngoscope 81; 365-372 (1971)
104. Leunig, A., Rick, K., Stepp, H., Goetz, A., Baumgartner, R., Feyh, J.:
Photodynamische Diagnostik von Neoplasien der Mundhöhle nach lokaler Applikation von 5-Aminolävulinsäure.
Laryngorhinootologie 75; 459-464 (1996a)
105. Leunig, A., Rick K., Stepp H., Gutmann R. Baumgartner R., Feyh J.:
Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-Aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity:
Am J Surg 172; 674-677 (1996b)
106. Leunig, A., Betz, C.S., Mehlmann, M., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R.:
Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence.
Laryngoscope 110, 78-83 (2000a)
107. Leunig, A., Mehlmann, M., Betz, C.S., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R.:
Fluoreszenzdiagnostik von Neoplasien im Mund-Rachen-Bereich nach Applikation von 5-Aminolävulinsäure.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000b, S. 51-64
108. Leunig, A., Betz, C.S., Mehlmann, M., Stepp, H., Arbogast, S., Grevers, G., Baumgartner, R.:
A pilot series demonstrating fluorescence staining of laryngeal papilloma using 5-aminolevulinic acid.
Laryngoscope 110; 1783-1785 (2000c)
109. Leunig, A., Betz, C.S., Baumgartner, R. Grevers, G. Issing, W.:
Initial experience in the treatment of oral leukoplakia with high-dose vitamin A and follow-up 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence.
Eur Arch Otorhinolaryngol 257; 327-331 (2000d)
110. Lippert, B.M., Kulkens, C., Klahr, N., Folz, B.J., Werner, J.A.:
5-Delta-Aminolävulinsäure induzierte Fluoreszenzdiagnostik bei Karzinomen der oberen Luftz- und Speisewege – erste Ergebnisse.

In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 65-73

111. Lippert, B.M., Folz, B.J., Kùlkens, C., Werner, J.A.:
5-ALA-induzierte Fluoreszenz-Endoskopie zur Diagnostik der rezidivierenden Papillomatose des oberen Aerodigestivtraktes.
Endoskopie heute 14; 49 (2001)
112. Lippert, B.M., Groß, U., Klein, M., Kùlkens, C., Klahr, N., Brossmann, P., Doss, M.O., Werner, J.A.:
Excretion measurement of porphyrins and ist precursors after topical administration of 5-aminolaevulinic acid for fluorescence endoscopy in head and neck cancer.
Res Com Pathol Pharmacol [im Druck] (2002)
113. Lippert, B.M., Werner, J.A.:
Photodynamische Therapie in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde.
In: Szeimies, R.M., Jocham, D., Landthaler, M.(Hrsg.):
Klinische Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Blackwell, Berlin [im Druck] (2002)
114. Lippert, B.M., Werner, J.A.:
Klinische und endoskopische Verfahren.
In: R. B. Schilcher (Hrsg.): Maligne Rezidive im Kopf-Halsbereich. Schattauer, Stuttgart [im Druck] (2002)
115. Lipson, R.L. Baldes, E.J., Olsen, A.M.:
The use of a derivatives of hematoprphyrin in tumor detection.
J Natl Cancer Inst 26; 1-11 (1961)
116. Loh, C., MacRobert, A., Bedwell, J., Regula, J., Krasner, N., Bown, S.:
Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy.
Br J Cancer 68; 41-51 (1993)
117. Lucchina, L.C., Kollias, N., Gillies, R., Phillips, S.B., Muccini, J.A., Stiller, M.J., Tranick, R.J., Drake, L.A.:
Fluorescence photography in evaluation of acne.
J Am Acad Dermatol 35; 58-63 (1996)
118. Lippa, P., Jacob, K., Ehret, W.:
The production of porphyrins from delta-aminolaevulinic acid by Haemophilus parainfluenzae.
J Med Microbiol 39; 262-267 (1993)
119. Mahnke, C.G.:
Laser surgery for laryngeal papillomatosis.
Adv Otorhinolaryngol 49; 162-165 (1995)
120. Malik, Z., Lugaci, H.:
Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous

- porphyrins.
Br J Cancer 56; 589-595 (1987)
121. Malzahn, K., Dreyer, T., Glanz, H., Arens, C.:
Autofluorescence endoscopy in the diagnosis of early laryngeal cancer and its precursor lesions.
Laryngoscope 112; 488-493 (2002)
 122. Mehlmann, M., Betz, C.S., Stepp, H., Arbogast, S., Baumgartner, R., Grevers, G., Leunig, A.:
Fluorescence staining of laryngeal neoplasms after topical application of 5-aminolevulinic acid. Preliminary results.
Lasers Surg Med 25; 414-420 (1999)
 123. Messmann, H., Knuchel, R., Baumler, W., Holstege, A., Scholmerich, J.:
Endoscopic fluorescence detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus, ulcerative colitis, or adenomatous polyps after 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX sensitization.
Gastrointest Endosc 49; 97-101 (1999)
 124. Meyer-Betz, F.:
Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs.
Dtsch Arch Klein Med 112; 476-503 (1913)
 125. Milkvay, P., Messmann, H., Debinski, H., Regula, J., Conio, M., MacRobert, A., Spigelman, A., Phillips, R., Bown, S.G.:
Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis - a pilot study.
Eur J Cancer 31A; 1160-1165 (1995a)
 126. Milkvay, P., Messmann, H., Regula, J., Conio, M., Pauer, M., Millson, C.E., MacRobert, A.J., Bown, S.G.:
Sensitization and photodynamic therapy (PDT) of gastrointestinal tumors with 5-aminolaevulinic acid (5-ALA) induced protoporphyrin IX (PpIX). A pilot study.
Neoplasia 42;109-113 (1995b)
 127. Moan, J., Streckyte, G., Bagdonas, S., Bech, O., Berg, K.:
Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid.
Int J Cancer 70; 90-97 (1997)
 128. Monnier, P., Savary, M., Fontollet, C., Wagnieres, G., Chatelain, A., Cornaz, T., Depeursinge, C., Berg, v.d. H.:
Photodetection and Photodynamic therapy of early squamous cell carcinoma of the pharynx, esophagus and tracheobronchial tree
Lasers Med Sci 5; 149-169 (1990)
 129. Morgenroth, K.:
Neue Untersuchungen mit dem Koloskop nach Hinselmann und der Vitalfärbung der Mundschleimhaut zur Frühdiagnose von Tumoren im

Kieferbereich.

Dtsch Zahnaerztl Z 12; 192-201 (1957)

130. Natsugoe, S., Uchino, Y., Kijima, F., Shimada, M., Shirao, K., Kusano, C., Baba, M., Yoshinaka, H., Fukumoto, T., Mueller, J., Stein, H.J., Aikou, T.:
Synchronous carcinomas of the esophagus and head and neck.
Dis Esophagus 10 134-138 (1997)
131. Navone, N., Polo, C., Frisardi, A., Andrade, N., del Battle, A.:
Heme biosynthesis in human breast cancer-mimetic „in vitro“ studies and some heme enzymic activity levels.
Int J Biochem 22; 1407-1411 (1990)
132. Nessel, E., Wiggemann, W.:
Der Tetracyclin-Fluoreszenztest in der Chirurgie maligner Tumoren.
Rhinolaryngologische Erfahrungen.
HNO 13; 346-349 (1965)
133. Niebel, H., Chomet B.:
In vivo staining test for the in vivo delineation of oral intraepithelial neoplastic change: preliminary report.
Am J Dent Assoc 631; 801-806 (1964)
134. Pantelides, M.L., Moore, J.V., Blacklock, N.J.:
A comparison of serum kinetics and tissue distribution of Photofrin II following intravenous and intraperitoneal injection in the mouse.
Photochem Photobiol 49; 67-70 (1989)
135. Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K.E., Nesland, J.M.:
5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy.
Cancer 79, 2282-2308 (1997)
136. Platz, H., Fries, R., Hudec, M.:
Einführung in die „Prospektive DÖSAK-Studie über Plattenepithelkarzinome der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx“.
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir 12; 293-302 (1988)
137. Policard, A.:
Etude sur les aspects offert par des tumeurs expérimentales examinées a la lumière de Wood.
C R Soc Biol (Paris) 91; 1423-4 (1924)
138. Portugal, L., Wilson, K., Biddinger, P., Gluckman, J.:
The role of toluidine blue in assessing margin status after resection of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract.
Arch Otolaryngol head Neck Surg 122; 517-519 (1996)
139. Pottier, R.H., Chow, Y.F., LaPlante, J.P., Truscott, T.G., Kennedy, J.C., Beiner, L.A.:
Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission

- spectra in vivo.
Photochem Photobiol 44; 679-687 (1986)
140. Pottier, R.H.:
In vitro and in vivo fluorescence monitoring of photosensitizers.
J Photochem Photobiol B 6;103-109 (1990)
 141. Rassmussen-Taxdall, D.S., Ward, G.E., Figge, F.H.:
Fluorescence of human lymphatic and cancer tissue following high dosis of intravenous hematoporphyrin.
Cancer 8; 78-81 (1955)
 142. Rasetti, L., Rubino, G.F., Drago, W.:
Ferrochelataze, ALA-dehydrase und ALA-synthetase activity in human tumour tissue.
Panminerva Med 8; 132-135 (1967)
 143. Rehberg, E., Kleinsasser, O.:
Malignant transformation in non-irradiated juvenile laryngeal papillomatosis.
Eur Arch Otorhinolaryngol 256; 450-454. (1999)
 144. Regula, J., MacRobert, A.J., Gorchein, A., Buonaccorsi, G.A., Thorpe, S.M., Spencer, G.M., Hatfield, A.R., Bown, S.G.:
Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5 aminolaevulinic acid induced protoporphyrin IX - a pilot study.
Gut 36; 67-75 (1995)
 145. Richart, R.:
A clinical staining test for the in vivo delineation of dysplasia and carcinoma in situ.
Am J Obstet Gynecol 86; 703-712 (1963)
 146. Richards-Kortum, R., Sevic-Muraca, E.:
Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis.
Annu Rev Phys Chem;47; 555-606 (1996)
 147. Rick, K. Sroka, R., Stepp, H., Kriegmair, M., Huber, R.M., Jacob, K., Baumgartner, R.:
Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood.
J Photochem Photobiol 40; 313-319 (1997)
 148. Riesenberger, R., Fuchs, C., Kriegmair, M.:
Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced prophyrin on human bladder carcinoma cells in vitro.
Eur J Cancer 2; 328-334 (1996)
 149. Ronchese, F.:
The fluorescence of cancer under Wood's light.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol 7; 967-971 (1954)

150. Ross, E.V., Romero, R., Kollias, N., Crum, C., Rox Anderson, R.:
Selectivity of protoporphyrin IX fluorescence for condylomata after topical application of 5-aminolaevulinic acid: implications for photodynamic treatment.
Br J Dermatol 137: 736-742 (1997)
151. Rubino, G.F., Rasetti, L.:
Porphyrin metabolism in human neoplastic tissue.
Panminerva Med 8; 290-292 (1966)
152. Rudert, H.H., Werner, J.A., Hoft, S.:
Transoral carbon dioxide laser resection of supraglottic carcinoma.
Ann Otol Rhinol Laryngol 108; 819-827 (1999)
153. Sabes, W., Singer, R., Kuhn, T.:
Effectiveness of toluidine blue as an aid to biopsy in the diagnosis of DMBA-induced hamster pouch dysplasia and carcinoma.
Cancer 29; 1584-1589 (1972)
154. Schiller, W.:
Zur klinischen Frühdiagnose des Portiokarzinoms.
Zentralbl Gynaecol 30; 1886-1892 (1928)
155. Schmidt, S.:
Photodynamische Laser-Therapie bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen.
Gebfra 56, 153-156 (1996)
156. Schmidt, S., Wagner, U., Spaniol, S., Krebs, D.:
Photodynamic therapy for dysplasia of the cervix.
J Gynecol Pathol 1; 6-7 (1996)
157. Schmidt, S., Krebs, D.:
Photodynamische Laser-Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Einsatzes von Photosensitizern der zweiten Generation.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 131-142
158. Schoenfeld, N., Epstein, O., Lahav, M., Mamet, R., Shaklai, M., Atsmon, A.:
The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders.
Cancer Lett; 43; 43-48 (1988)
159. Schomacker, K.T., Frisoli, J.K., Comptom, C.C., Flotte, T.J., Richter, J.M., Nishiioka, N.S., Deutsch, T.F.:
Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential
Lasers Surg Med 12; 63-78 (1992)
160. Schweitzer, V.G.:
Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer.

Otolaryngol Head Neck Surg 102, 225-232 (1990)

161. Sharvill, D.:
On the red fluorescence of certain ulcers under the Wood's light.
Trans St John's Hosp Derm Soc (Lond) 34; 32-36 (1955)
162. Shedd, D.P.; Hukill, P.B., Bahn, S.:
In vivo staining properties of oral cancer.
Am J Surg 110; 631-634 (1965)
163. Siersema, P.D., ten Kate, F.J., Mulder, P.G., Wilson, J.H.:
Hepatocellular carcinoma in porphyria cutanea tarda: frequency and factors
related to its occurrence.
Liver 12; 56-61 (1992)
164. Silverman, S.:
Early diagnosis of oral cancer.
Cancer 62; 1796-1799 (1988)
165. Silverman, S.:
Epidemiology.
In: Silverman, S. (Hrsg.): Oral Cancer, The American Cancer Society, New
York, 1992, S. 2-6
166. Slaughter, D., Southwick, H., Smejkal, W.:
Field cancerization in oral stratified squamous epithelium.
Cancer 6; 963-968 (1953)
167. Smith, A.:
Mechanisms of toxicity of photoactivated artificial porphyrins - role of
porphyrin-protein interactions.
Ann N Y Acad Sci 154; 309-322 (1987)
168. Statistisches Landeamt Saarland (1996):
Morbidity and Mortality of malignant neoplasms in Saarland.
Statistisches Landesamt Saarland 1996
169. Steinberg, B.M., Topp, W.C., Schneider, P.S., Abramson, A.L.:
Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission.
N Engl J Med 308; 1261-1264 (1983)
170. Strong, M., Incze, J., Vaughan, C.:
Field cancerization in the aerodigestivtract: its etiology, manifestation, and
significance.
J Otolaryngol 13; 1-6 (1984)
171. Strong, M.S., Vaughan, C.W., Incze, J.S.:
Toluidine blue in the management of carcinoma of the oral cavity.
Arch Otolaryngol 87; 527-531 (1968)

172. Stummer, W., Stocker, S., Wagner, S., Stepp, H., Fritsch, C., Goetz, C., Goetz, A.E., Kieffmann, R., Reulen, H.J.:
Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence.
Neurosurgery 42; 518-525 (1998)
173. Svaasand, L.O., Ellingsen, R.:
Optical penetration in human intracranial tumors.
Photochem Photobiol 41; 73-76 (1985)
174. Svanberg, K., Andersson, T., Killander, D.:
Photodynamic therapy of human skin malignancies and laser-induced fluorescence diagnostics utilizing Photofrin and delta-aminolevulinic acid.
In: Spinelli, P., Dal Fante, M., Marchesini, R. (Hrsg.): Photodynamic therapy and Biomedical Lasers. Excerpta Medica, London 1993 S. 436-440
175. Svanberg, K., Andersson, T., Killander, D., Wang, I., Stenram, U., Andersson-Engels, S., Berg, R., Johansson, J., Svanberg, S.:
Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumors of the skin using topical delta-aminolevulinic acid sensitization and laser-irradiation.
Br J Dermatol 130; 743-751 (1994)
176. Svanberg, K., Klinteberg, C., Nilsson, A., Wang, I., Andersson-Engels, S., Svanberg, S.:
Laser-based spectroscopic methods in tissue Characterization.
Ann N Y Acad Sci 9;838; 123-129 (1998a)
177. Svanberg, K., Wang, I., Colleen, S., Idvall, I., Ingvar, C., Rydell, R., Jocham, D., Diddens, H., Bown, S., Gregory, G., Montan, S., Andersson-Engels, S., Svanberg, S.:
Clinical multi-colour fluorescence imaging of malignant tumours – initial experience.
Acta Radiologica 39; 2-9 (1998b)
178. Szeimies, R.M., Calavaraa-Pinton, P., Karrer, S., Ortel, B., Landthaler, M.:
Topical photodynamic therapy in dermatology.
Photochem Photobiol B 36, 213-219 (1996a)
179. Szeimies, R.M., Karrer, S., Sauerwald, A., Landthaler, M.:
Photodynamic therapy with topical application of 5-aminiolevulinic acid in the treatment of actinic keraoses: a initial clinical study.
Dermatology 192; 246-251 (1996b)
180. Szeimies, R.M., Ackermann, G., Landthaler, M., Abels, C.:
Fluoreszenzdiagnostik epithelialer Tumoren.
In: Lippert, B.M., Schmidt, S., Werner, J.A. (Hrsg.): Fluoreszenzdiagnostik und Photodynamische Therapie. Shaker Verlag, Aachen 2000, S. 7-13
181. Tachikawa, T., Yamamura, T., Yoshiki, S.:
Changes occuring in plasma membranes and intercellular junctions during the process of carcinogenesis and in squamous cell carcinoma.

182. Thurner, D., Formanek, M., Burian, M.:
Photodynamic diagnostic and therapy in ENT – two case reports.
In: Lippert BM, Werner JA (Hrsg.) Metastases in head and neck cancer. Tectum Verlag 2001; S 429-432.
183. Tralau, C.J., Barr, H., MacRobert, A.J., Brown, S.G.:
Relative merits of porphyrins in pthalocyanine sensitization of photodynamic therapy.
In: Kessel, D. (Hrsg.): Photodynamic therapy of neoplastic disease. CRC Press, Boca Raton, FL 1990, S. 263-275
184. Unsöld, E.:
Die photodynamische Therapie, eine fachübergreifende Methode der Laser-Tumorthherapie.
In: Müller, G., Berlien, H.-P. (Hrsg.): Lasertechnologie und Lasermedizin, Bd. 13, ecomed, Landsberg 1995, S. 177-183
185. van Hillegersberg, R., van den Berg, J.W., Kort, W.J., Terpstra, O.T., Wilson, J.H.:
Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats.
Gastroenterology 103:647-651 (1992)
186. van Hillegersberg, R., Kort, W.J., Wilson, J.H.P.:
Current status of photodynamic therapy in oncology
Drugs 48 (4); 510-527 (1994)
187. van Hillegersberg, R., Hekking-Weijma, J.M., Wilson, J.H., Edixhoven, -Bosdijk, A., Kort, W.J.:
Adjuvant intraoperative photodynamic therapy diminishes the rate of local recurrence in a rat mammary tumour model.
Br J Cancer 71; 733-737 (1995)
188. von Röder, B.:
Photosensibilisatoren für die photodynamische Therapie.
In: Berlien, H.P., Müller, G. (Hrsg.): Angewandte Lasermedizin, ecomed, Landsberg 1989, 6. Erg. Lfg. 2/93, III-3.15.1, S1-12
189. von Tappeiner, H.U., Jesionek, A.:
Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen.
Münch Med Wochenschr 50; 2042-2044 (1903)
190. von Tappeiner, H., Jodlbauer, A.:
Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffen auf Protozoen und Enzyme.
Dtsches Arch Klein Med 39, 427-87 (1904)
191. Webber, J., Kessel, D., Fromm, D.:
Plasma levels of protoporphyrin IX in humans after oral administration of 5-

- aminolevulinic acid.
J Photochem Photobiol B 37; 151-153 (1997)
192. Wenig, B.L., Kurtzman, D.M., Grossweiner, L.I., Mafee, M.F., Harris, D.M., Lobraico, R.V., Prycz, R.A., Appelbaum, E.L.:
Photodynamic therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116, 1267-1270 (1990)
 193. Werner, J. A.:
Aktueller Stand der Versorgung des Lymphabflusses maligner Kopf-Hals-Tumoren.
In Theissing, J. (Hrsg.): Klinik und Therapie in der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie im Wandel. Verhandlungsbericht Dtsch. Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Springer, Berlin 1997, S. 47-85
 194. Werner, J.A; Dünne, A.A.:
Value of neck dissection in patients with squamous cell carcinoma of unknown primary.
Onkologie 24; 16-20 (2001)
 195. Werner, J.A., Rathcke, I.O., Mandic, R.:
The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck.
Clin Exp Metastasis 19; 275-282 (2002a)
 196. Werner, J.A.; Dünne, A.A., Lippert, B.M.:
Indikationen zur Halsoperation bei nicht nachweisbaren Lymphknotenmetastasen Teil I: Grundlagen zum lymphogenen Metastasierungsverhalten von Kopf-Hals-Karzinomen.
HNO 50; 253-262 (2002b)
 197. Wolf, P.;
Photodynamische Therapie.
Dt Ärztebl 96; A-1493-1498 (1999)
 198. Wyss-Desserich, M.T., Sun, C.H., Wyss, Kurlawalla, C.S., Haller, U., Berns, M.W., Tadir, Y.:
Accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in normal and neoplastic human endometrial epithelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 224; 819-824 (1996)
 199. Žargi, M., Šmid, L., Fajdar, I., Bubenec, B., Lenarcic, J., Oblak, P.:
Laser induced fluorescence in diagnostics of laryngeal cancer.
Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 527: 125-127 (1997)
 200. Žargi, M., Fajdiga, I., Šmid, L.:
Autofluorescence imaging in the diagnosis of laryngeal cancer.
Eur Arch Otorhinolaryngol 257; 17-23 (2000)

201. Zenk, W., Dietel, W., Schleier, P., Gunzel, S.:
Visualisierung von Karzinomen der Mundhöhle durch Stimulierung der
Synthese von fluoreszierendem Protoporphyrin IX.
Mund Kiefer Gesichtschir 3; 205-209 (1999)

9 Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J.A. Werner, Direktor der Marburger Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. B.M. Lippert, Ltd. Oberarzt der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde in Marburg danken. Für die Überlassung des Themas, seine stetige Unterstützung, für die anregenden, zahlreichen Diskussionen und die wohlwollende Förderung, die so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Chr. Külkens, Oberarzt der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der mir durch seine engagierte, intensive Betreuung, seine Ermutigung und seine Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe war.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M.O. Doss ehemaliger Leiter des Funktionsbereiches Klinische Biochemie und seinem ehemaligem Mitarbeiter Herrn Dr. U. Gross für die Beratung in Fragen des Porphyrinstoffwechsels und des Photosensibilisators ALA. In diesem Zusammenhang danke ich besonders auch Herrn Dr. M. Ossendorf, Oberarzt der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik.

Danken möchte ich recht herzlich Herrn Prof. Dr. S. Schmidt, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Marburg für seine zahlreichen beratenden Gespräche im Erfahrungsaustausch über die Methode der hier vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. A. Moll Leiter des Institutes für Pathologie und seiner Mitarbeiterin Frau Dr. A. Ramaswamy, Oberärztin des Institutes danke ich für die Aufarbeitung und histologische Beurteilung der entnommen Gewebeproben.

Frau M. Schüler danke ich für die technische Hilfe bei der Erstellung der Fotoarbeiten.

Nicht zuletzt danke ich den medizinisch technischen Assistentinnen des onkoklogischen Labores der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Frau R. Peldszus und Frau M. Sadowski, die mit Ihren hilfreichen Anleitungen bei der Aufarbeitung des Photosensibilisators ALA tatkräftige Hilfen waren.

Abschließend möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, die mir den Weg ins Studium ermöglicht haben. Mein ganz herzlichster Dank gilt meiner besten Freundin Dagmar, die mir in allen Phasen dieser Arbeit immer eine wertvolle Hilfe war.

Am meisten aber danke ich wegen seiner Geduld, seiner Unterstützung und seiner Liebe, Christoph.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Privatdozenten in Marburg:

Aumüller, Aurich, Austermann, Bath, Berndt, Czubayko, Dibbets, Feuser, Flores de Jakoby, Fruhsdorfer, Gente, Geus, Habermehl, Hochbahn, Junclas, Katschinski, Kern, Lehmann, Löffler, Lotzmann, Mittag, Neumüller, Peter, Pieper, Radsack, Richter, Schachtschabel, Stachniss, Weihe, Werner, Zelder